

Lidia Sayuri Mori

**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E DO
DERIVADO SEMI-SINTÉTICO DA XILOPINA, N-ACETIL XILOPINA, OBTIDOS
DE *Magnolia ovata*”**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal
do Paraná como requisito parcial à obtenção
do grau de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aleksander
Roberto Zampronio

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Cândida
Kassuya

Curitiba

2010

Lidia Sayuri Mori

**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E DO
DERIVADO SEMI-SINTÉTICO DA XILOPINA, N-ACETIL XILOPINA, OBTIDOS
DE *Magnolia ovata*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Cândida Kassuya

Curitiba

2010

Dedico esta dissertação à minha família. Meus pais Alice e Haruhiko, meus irmãos Carolina, Edson e Rodrigo e ao Ricardo, meu amor.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos.

Aos meus queridos pais Alice e Haruhiko pelo amor incondicional e apoio sempre.

Aos meus amados irmãos Carolina, Edson e Rodrigo pela amizade pura e carinho sempre.

Ao meu namorado Ricardo pela paciência, apoio e compreensão sempre.

Ao Professor Aleksander Roberto Zampronio pelos valiosos ensinamentos, pela confiança, pelo carinho e por ter acreditado.

À Professora Cândida Kassuya pelos valiosos ensinamentos, pela amizade e carinho sempre

À Professora Maria Élide Stefanello e à Letícia F. L. Barros pelo fornecimento do extrato e composto da *M. ovata*.

Às minhas amigas Rosiane Toporoski, Fernanda Trombini, Caroline Grzybowski e Valéria Oshiro pela amizade, carinho, força e apoio que me fizeram seguir em frente.

À minha amiga Priscila de Souza pelo apoio, carinho, amizade e sua grande contribuição.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre e do Departamento de Farmacologia da UFPR que contribuíram com meu trabalho e tornaram a convivência prazerosa.

À todos os Professores do Departamento de Farmacologia que contribuíram para a minha formação.

À todos os funcionários e servidores pela contribuição.

Agradeço também à CAPES pelo apoio financeiro.

“Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que as cheias as abaixam para a terra, sua mãe.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) Definição de Dor	1
1.2) Mecanismos para a indução/processamento da dor	3
1.3) Dor, nocicepção e hiperalgesia	7
1.4) Dor Inflamatória	8
1.5) Importância da busca de novos analgésicos e das plantas como fonte..	13
2) <i>Magnolia ovata</i>	17
3) OBJETIVOS	23
3.1) Objetivo Geral	23
3.2) Objetivos Específicos	23
4) MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1) Animais	24
4.2) Material Botânico, preparação do extrato, fracionamento, isolamento e identificação do composto ativo	24
4.3) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva	26
4.3.1) Teste das contorções abdominais induzidos pelo ácido acético	26
4.3.2) Nocicepção induzida pela formalina	26
4.3.3) Hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Cg)	27
4.3.3.1) Estudo dos mecanismos dos efeitos antinociceptivos da N-acetil xilopina	28
4.3.4) Teste da placa quente	29
4.4) Efeito sobre o desempenho motor ("rota-rod")	29
4.5) Drogas e Reagentes	30
4.6) Análise Estatística	30
5) RESULTADOS	31

5.1) Efeitos da EEMO e AXIL nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	31
5.2) Efeitos do EEMO e AXIL na nocicepção induzida pela formalina	33
5.3) Efeitos de EEMO e AXIL na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina	35
5.4) Efeito da injeção local de AXIL na hiperalgesia induzida pela carragenina	37
5.6) Efeito do tratamento com AXIL local na hiperalgia mecânica induzidas por BK, TNF- α , IL-1 β , e PE-G2	41
5.7) Efeito do tratamento com AXIL local na hiperalgesia mecânica induzidas por CINC-1 e DA.....	43
6) DISCUSSÃO	45
7) CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO 1 – “ARTICLE IN PRESS” – PHYTOMEDICINE	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mediadores inflamatórios.....11

Tabela 2 – Resumo das classes químicas de *Magnolia* spp.....19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vias nociceptivas ascendentes.....	6
Figura 2.	Via Descendente inibitória da dor.....	7
Figura 3.	Cascata de citocinas na sensibilização de nociceptores: Diagrama da sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina, intermediada por citocinas e indução final de prostanóides (PGs) e aminas simpática (SA).....	13
Figura 4.	Árvore, flores e frutos de <i>Magnolia ovata</i>	17
Figura 5.	Substâncias previamente isoladas das cascas do tronco de <i>M. ovata</i>	21
Figura 6.	Estrutura química da xilopina (1), isolada de <i>Magnolia ovata</i> e N-acetil xilopina (AXIL) (2).....	22
Figura 7.	Efeito da EEMO e AXIL nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	32
Figura 8.	Efeitos do EEMO e AXIL na nocicepção induzida pela formalina	34
Figura 9.	Efeitos de EEMO e AXIL na alodinia mecânica induzida pela carragenina.....	36
Figura 10.	Efeito da injeção local de AXIL na alodinia induzida pela carragenina	38

Figura 11. Efeito do tratamento com EEMO e AXIL no teste da placa quente e no desempenho motor (“ <i>rota-rod</i> ”).....	40
Figura 12. Efeito do tratamento com AXIL local na alodinia mecânica induzidas por BK, TNF- α , IL-1 β , e PGE ₂	42
Figura 13. Efeito do tratamento com AXIL local na alodinia mecânica induzidas por CINC-1 e DA.....	44
Figura 14. Quimiocinas, classificação e seus receptores.....	52

LISTA DE ABREVIACÕES

AINE	Antiinflamatório não esteroideal
ATP	Adenosina trifosfato
AXIL	N-acetil xilopina
BK	Bradicinina
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
Cg	Carragenina
CINC-1	Químioatraente para neutrófilos induzidos por citocinas 1
COX	ciclooxigenase
DA	Dopamina
DI_{50}	Dose inibitória 50%
EEMO	Extrato etanólico de <i>Magnolia ovata</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
IASP	Associação Internacional para os Estudos da Dor
IL	Interleucina
$\text{IL-1}\beta$	Interleucina 1 β
Indo	Indometacina
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
KC	quimiocina derivado de queratinócitos
NGF	Fator de crescimento neural
NO	Óxido nítrico

OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Prostaglandina
PG-E ₂	Prostaglandina E ₂
SA	Aminas simpáticas
Sal.	Salina
s.c.	Subcutâneo
TNF- α	Fator α de necrose tecidual
Veic.	Veículo
v.o.	Via oral
%MPE	% Máxima de Efeito Possível

RESUMO

A dor representa uma sensação desagradável, mas ela é fundamental para a sobrevivência do indivíduo, devido a sua função protetora. Apesar disso, pelo caráter incapacitante da dor em certas condições patológicas, o homem tem buscado substâncias analgésicas potentes e com poucos efeitos adversos. Neste contexto, as plantas representam uma importante fonte para a busca de medicamentos, inclusive de analgésicos. Várias espécies de plantas do gênero *Magnolia* são usadas na medicina popular especialmente no Brasil e Ásia. Plantas deste gênero são árvores, incluindo *Magnolia ovata*, que é amplamente dispersa pelo país. As cascas do tronco de *M. ovata* são usadas na medicina popular como antipirético enquanto que as folhas são consideradas úteis contra diabetes. O uso contra diabetes não foi confirmado cientificamente, mas o uso como antipirética e antiinflamatória foi comprovado pelo nosso grupo de pesquisa. Pelo fato de diversas substâncias que possuem efeito antipirético compartilharem também o efeito analgésico, objetivamos nosso estudo no sentido de estudar o efeito antinociceptivo nesta planta e também iniciar os estudos de um possível mecanismo de ação para a N-acetil xilopina, um derivado do composto isolado, xilopina da *M. ovata*. Nesse estudo, foi utilizado o extrato etanólico obtido das cascas do tronco de *M. ovata* (EEMO) (10-100 mg/kg) e o derivado N-acetil xilopina (AXIL) (0,015-0,15 mg/kg v.o. e 0,3-30ng/pata) em modelos experimentais de nocicepção em camundongos. Os resultados do presente estudo evidenciam que o extrato e AXIL apresentam ações analgésicas em modelos experimentais de nocicepção. EEMO e AXIL inibiram a nocicepção induzida por ácido acético, com inibição máxima de $91 \pm 9\%$ e $50 \pm 11\%$, respectivamente. A administração oral de EEMO e AXIL também inibiu significativamente a fase inflamatória da nocicepção induzida pela formalina com redução máxima de $87 \pm 3,9\%$ e $71 \pm 10\%$, respectivamente. Comprovando a efetividade do extrato e composto isolado na resposta inflamatória, EEMO e AXIL inibiram a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, com inibição de $40 \pm 6\%$ para EEMO e $82 \pm 8\%$ para AXIL. O efeito antinociceptivo da *Magnolia ovata* parece ser, pelo menos em partes, devido à presença da xilopina. É possível que AXIL esteja atuando principalmente periféricamente, não envolvendo ações

centrais uma vez que nem o extrato bruto, nem a AXIL foram eficazes no teste da placa quente e “rota-rod”. Essa ação antinociceptiva ocorre no componente de prostaglandinas da sensibilização periférica de nociceptores, por ter inibido a hiperalgesia induzida por BK, TNF- α , IL-1 β e PGE₂, mas não no componente simpático, pela não inibição da alodinia induzida por CINC-1 e DOPA em camundongos. Sendo assim, a AXIL evidencia a possibilidade para o surgimento de um novo medicamento para a prevenção de dor pós-cirúrgica e demais afecções relacionadas à dor inflamatória, uma vez que a xilopina parece ter seu mecanismo de ação diretamente nas vias periféricas da dor.

ABSTRACT

Pain is an unpleasant feeling but it is essential to the survival of the individual, due to its protective function. Nevertheless, the disabling nature of pain in certain pathological conditions has lead to a continuous search for potent analgesic substances with few adverse effects. In this context, plants represent an important source of analgesic drugs. Several species of plants belonging to the genus *Magnolia* are used in folk medicine, especially in Brazil and Asia. Plants from this genus are trees, including *Magnolia ovata* that is widely scattered throughout Brazil. The bark of the trunk of *M ovata* is used in folk medicine as antipyretic while the leaves are considered useful against diabetes. The anti-diabetic action has not been confirmed scientifically, but its antipyretic and anti-inflammatory action has been confirmed by our group. Since several substances that have antipyretic effect also share an analgesic effect, we proposed to study the antinociceptive effect this plant and also begin studies of a possible mechanism of action for the N-acetyl xilopine (AXIL), a derivative of the compound isolated from xilopina of *M. ovata*. In this study, we used the ethanolic extract obtained from the bark of the trunk of *M ovata* (10-100 mg/kg) and the derivative N-acetyl xilopine (0.015-0.15 mg/kg po and 0.3-30ng/paw) in experimental models of nociception in mice. The results of this study indicate that the extract and AXIL have analgesic actions in experimental models of nociception. The EEMO and AXIL inhibited the nociception induced by acetic acid in mice, with a maximal inhibition of $91 \pm 9\%$ and $50 \pm 11\%$, respectively. Oral administration of EEMO or AXIL also significantly inhibited the

inflammatory phase of formalin-induced nociception with maximal reduction of $87 \pm 3.9\%$ and $71 \pm 10\%$, respectively. Confirming the effectiveness of the extract and the isolated compound in inflammatory responses, EEMO or AXIL inhibited carrageenan-induced mechanical allodynia with percentage of inhibition of $40 \pm 6\%$ for EEMO and $82 \pm 8\%$ for AXIL. Antinociceptive effect of *Magnolia ovata* seems, at least in part, due to the presence of xilopina. Is possible that AXIL are working mainly peripherally and does not involve central actions since neither the crude extract nor AXIL were effective on hot plate and "rota-rod" tests. Its action seems to be related to the prostaglandin component of peripheral sensitization of nociceptors, because it inhibited the allodynia induced by bradykinin, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ and PGE_2 , but not in the sympathetic component, because not inhibition of allodynia induced by CINC-1 and dopamine in experimental models in mice. Thus, the N-acetyl xilopine suggests the possibility for the emergence of a new drug for the prevention of post-surgical pain and other conditions related to inflammatory pain, since xilopine seems to have its mechanism of action directly in peripheral pain pathways.

1) INTRODUÇÃO

1.1) Definição de Dor

Na literatura, existe uma grande variedade de definições para a dor e talvez nenhuma delas consiga agrupar todos os diferentes aspectos desta sensação.

Desta forma, a dor, por ser uma experiência subjetiva, é de difícil definição apesar do conhecimento do seu significado. Tipicamente, a dor é uma resposta direta a um evento indesejável associado a uma lesão tecidual, como um trauma, inflamação ou câncer. No entanto, a dor intensa pode originar-se independentemente de qualquer causa predisponente óbvia ou persistir por muito tempo depois que a lesão precipitante esteja resolvida. Também pode ocorrer por lesão cerebral ou de nervo.

Julius e Basbaum descreveram a dor como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução do estímulo nocivo ambiental, mas envolve também o processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (Julius e Basbaum, 2001). Vários estudos descrevem o papel fisiológico da dor como um alarme que tem a função de proteger o organismo ativando reações e induzindo comportamentos de precaução que podem diminuir o que estiver causando a dor e, como resultado, limitar os danos (Markenson, 1996, Millan, 1999, Costigan e Woolf, 2000, Woolf e Salter, 2000, Almeida *et al.*, 2004). Le Bars e colaboradores estabeleceram funções para a sensação de dor: avisar o indivíduo da probabilidade de que uma lesão tecidual está para ocorrer, por percepção de que certo estímulo pode causar dano tecidual e alertar um grupo de indivíduos de perigo assim que ele surge para um de seus membros (Le Bars *et al.*, 2001). Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a ameaça de dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada com respostas endócrinas como a secreção de corticosterona e ativação simpática, levando a hipertensão arterial e taquicardia que, juntos com uma antinocicepção transitória, auxiliam o melhoramento do desempenho dos repertórios comportamentais, permitindo o afastamento de situações de risco com sucesso (Millan, 1999). Desta forma, apesar da dor ser uma sensação tão desagradável ela é de fundamental

importância para a sobrevivência do organismo, tendo uma importante função protetora.

Para Almeida *et al.* as manifestações de dor podem ser entendidas com base nos substratos neurais que medeiam as funções sensoriais e afetivas: enquanto o sistema sensorial, percebe e permite a localização espaço-temporal, a qualificação física e a intensidade do estímulo nocivo, o componente cognitivo-afetivo atribui emoções à experiência, sendo responsável pelas respostas comportamentais à dor (Almeida et al., 2004). Assim, a dor tem uma conotação individual e sofre a influência de experiências anteriores. Logo, a dor se manifesta de duas formas: uma é a resposta de aviso que promove a sobrevivência no ambiente hostil e perigoso, enquanto a outra pode ser resultado de mudanças no sistema nervoso, que podem ser patológicas. Esta última sendo responsável por sofrimento persistente de milhões de pacientes (Woolf, 2000). Esta opinião é compartilhada por Julius e Basbaum (2001), pois a dor persistente perde sua utilidade como sistema de aviso protetor e se torna crônica e debilitante. Esta segunda forma de dor adaptativa se manifesta uma vez que a lesão tecidual ocorreu, onde o intuito é tentar auxiliar o reparo. A dor contribui para estabelecer um estado de hipersensibilidade localizada dentro e ao redor da região lesada. Um estímulo que normalmente acarretaria apenas uma sensação inócua torna-se desconfortável (Woolf, 2000).

Enfim, apesar das diversas definições existentes para descrever a dor, uma das que descreve de forma mais completa é a da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP do inglês, *International Association for the Study of Pain*), que em 1986 conceituou a dor como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões.”

Além disso, a dor pode ser classificada levando-se em consideração alguns parâmetros como duração, se a dor é fisiológica ou não e a localização central ou periférica. No que se refere à duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ser pontual delimitada e desaparecer com a resolução do processo patológico. A dor crônica persiste por um longo período de tempo, sendo associada a processos patológicos crônicos e mudanças no padrão de transmissão neuronal (Lent, 2004, Almeida et al., 2004).

1.2) Mecanismos para a indução/processamento da dor

A dor inicia-se com o estímulo nociceptivo, que ativa ou sensibiliza os nociceptores, que são os receptores do estímulo nocivo (Sandkuhler, 2009). Esse estímulo nocivo é levado da periferia para o sistema nervoso central através das fibras nociceptivas, que são aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos (Raja et al., 1999)

Os receptores da dor (nociceptores) fazem a transdução e codificação do estímulo nocivo e estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo. Existem nociceptores que podem responder a uma modalidade de estímulo ou a diferentes estímulos como mecânicos, térmicos e químicos (Lent, 2004).

Resumidamente, o processamento neural dos estímulos nocivos segue uma sequência de eventos, sendo que a primeira etapa se inicia com a estimulação e consequente transdução dos estímulos nocivos, ou seja, qualquer que seja o estímulo que excite o nociceptor, o efeito imediato é a alteração do potencial elétrico da membrana da fibra nervosa. Posteriormente este estímulo é transmitido para medula espinhal e depois para regiões superiores do SNC. E por fim, pode ocorrer a modulação da dor, outro aspecto do processamento deste estímulo nocivo (Guyton e Hall, 2002, Lent, 2004).

A ativação dos nociceptores por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos leva à despolarização do neurônio e gera um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra (Woolf e Salter, 2000). Por outro lado, uma inflamação pode conter mediadores inflamatórios ou provocar uma lesão que ativa ou sensibiliza os nociceptores locais. No fenômeno que envolve a sensibilização, as fibras nervosas sensibilizadas assumem limiares de ativação mais baixos (Julius e Basbaum, 2001).

As fibras aferentes de primeira ordem foram classificadas em termos de estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A α e A β , A δ ou C (Costigan e Woolf, 2000, Julius e Basbaum, 2001). As fibras A α e A β são mielinizadas, com diâmetro maior que 40 μ m e velocidade de condução de 30-100 m/s. As fibras aferentes A δ são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0-6,0 μ m e têm velocidade de transmissão de 12-30 m/s. Fibras não mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4-1,2 μ m e mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s. Neurônios que possuem corpos celulares

de maior diâmetro dão origem às fibras sensoriais mielinizadas de rápida condução do tipo A β que detectam estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações, não contribuindo, assim, para a nocicepção. No entanto, corpos celulares de pequeno e médio diâmetro dão origem à maioria dos nociceptores, incluindo fibras C e do tipo A δ . Há duas classes principais de nociceptores do tipo A δ (I e II): ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser distinguidas por sua capacidade de responder a estímulos de calor intenso ou como são afetadas pela lesão tecidual. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A maioria das fibras C também é polimodal, (ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos). Algumas são insensíveis a estímulos mecânicos, mas respondem ao calor nocivo. É importante salientar que a maioria das fibras C também responde a estímulos nocivos de origem química, como ácidos. Entretanto, é difícil de identificar o estímulo natural de alguns nociceptores. Estes são chamados “nociceptores silenciosos” ou “adormecidos”, que passam a ser ativados apenas quando sensibilizados por lesão tecidual (Julius e Basbaum, 2001).

Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A δ (que conduzem a dor primária, com estrita correlação com o estímulo e precisa localização espacial) e a nocicepção difusa e lenta, em queimação, é conduzida por fibras C (dor secundária, dor que continua mesmo após o estímulo nocivo ter cessado, dor de difícil localização e relacionada ao sofrimento). A dor visceral freqüentemente é pouco localizada, profunda e lenta. A lesão tecidual não é fundamental para que a dor visceral exista; ela pode resultar de uma distensão excessiva (Julius e Basbaum, 2001, Lent, 2004).

Após a transdução do estímulo, este é transmitido através das fibras A δ e C, que se incorporam aos demais nervos periféricos e penetram na medula através dos nervos espinhais e no tronco encefálico através do nervo trigêmeo (complexo sensorial trigeminal). Os corpos dos neurônios primários da dor localizam-se nos gânglios espinhais e no gânglio trigêmeo. A maioria dos neurônios de segunda ordem situa-se no corno dorsal da medula e no núcleo espinal do trigêmeo, onde recebem as sinapses dos aferentes de primeira ordem (Lent, 2004).

O corno dorsal da medula espinhal funciona como uma estação relé, ou seja, uma estação de retransmissão dos impulsos sensoriais para a transmissão da dor, aonde as fibras aferentes primárias chegam de maneira altamente organizada, com as fibras mielinizadas A δ terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II. A partir destas regiões, são acionados neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem na medula espinhal, sendo que alguns são ativados somente por estímulos nocivos (específicos para a nocicepção) e outros respondem a estímulos de alta ou baixa intensidade (limiar dinâmico e amplo). Esta conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (Millan, 1999).

Os neurônios de segunda ordem emitem axônios dentro da medula que cruzam para o lado oposto e se incorporam ao feixe espinotalâmico na coluna anterolateral da medula e ascendem até o tronco encefálico encontrando fibras de segunda ordem do núcleo espinhal do trigêmeo, formando o lemnisco espinhal. Até aqui, as fibras A δ (dor rápida) estão misturadas às C (dor lenta). Alguns anatomistas distinguem entre o feixe neoespinotalâmico (impulsos da dor rápida) e o feixe paleoespinotalâmico ou espino-reticulo-talâmico (impulsos da dor lenta) que se dirigem ao tálamo, passando pela formação reticular. Fibras do sistema nociceptivo mais antigo terminam em regiões do tronco encefálico, como na formação reticular e grisea periaquedutal, promovendo reações comportamentais e fisiológicas da dor. Os impulsos da dor rápida vão para os núcleos talâmicos posterior e ventral posterior, onde estão os neurônios de terceira ordem cujos axônios projetam ao córtex somestésico primário. Isso caracteriza a via direta da dor rápida com três neurônios e duas sinapses antes do córtex (Millan, 1999, Lent, 2004);

Já a dor lenta possui fibras de primeira ordem com terminações extensas e ramificadas, que podem convergir. As fibras secundárias se dirigem ao tálamo e à área somestésica primária e também para diversas outras regiões do SNC que controlam os fenômenos vegetativos e emocionais. Algumas fibras de segunda ordem projetam aos neurônios do sistema reticular ascendente (formação reticular), outras projetam a núcleos do sistema límbico e tálamo. As informações

nociceptivas chegam também ao córtex cingulado anterior, além do córtex somestésico (Lent, 2004).

No que se refere à modulação do estímulo nocivo, permite a inibição ou facilitação seletiva dos sinais nociceptivos que chegam ao corno dorsal da medula espinhal (Ren e Dubner, 2002). O sistema de modulação endógeno é constituído de interneurônios nas camadas superficiais da medula espinhal na qual há participação de peptídeos endógenos (endorfinas, encefalinas, dinorfinas), cuja função é modular as sinapses nociceptivas, bloqueando a liberação de neurotransmissores excitatórios pelo terminal pré sináptico e hiperpolarizando a membrana pós sináptica. Todos esses peptídeos endógenos são encontrados na substância cinzenta periaquedutal, nos núcleos da rafe e no corno dorsal da medula (Lent, 2004).

Os Fluxogramas (Figura 1 e 2) a seguir resumem as vias ascendentes nociceptivas e as vias descendentes inibitórias da dor:

Vias Aferentes

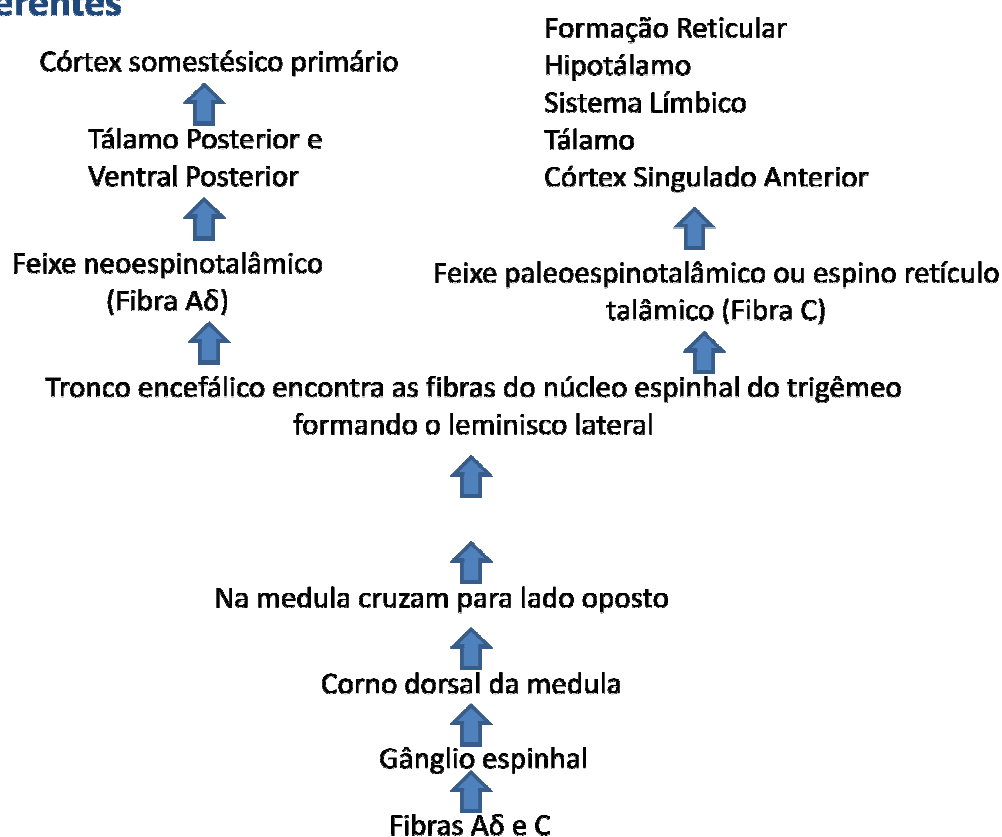


Figura 1. Vias nociceptivas ascendentes

Mecanismos Analgésicos Endógenos e Vias descendentes moduladoras da dor

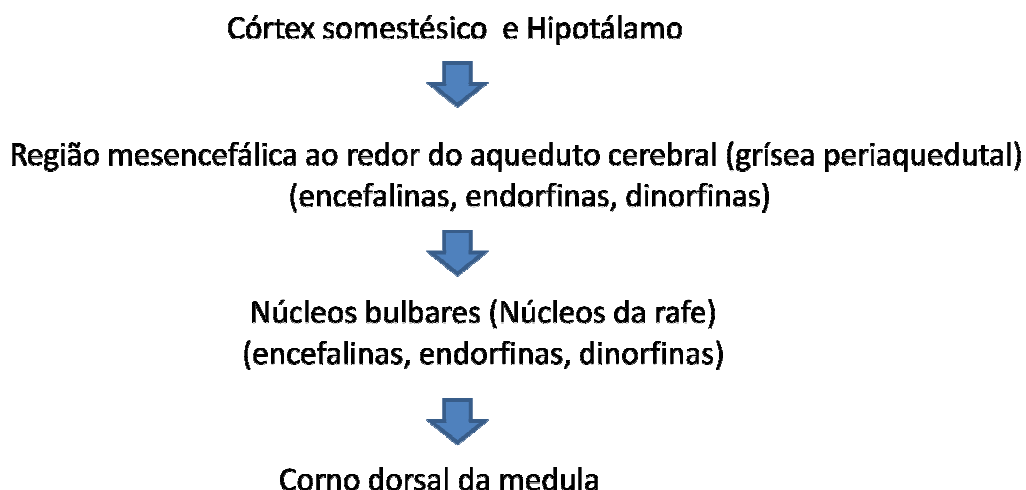


Figura 2. Via Descendente inibitória da dor.

1.3) Dor, nocicepção e hiperalgesia

Existe distinção entre os termos dor, nocicepção e hiperalgesia.

Para melhor entender estes conceitos, Dor, como descrito na definição da IASP (“experiência sensorial e emocional desagradável que está associada com lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”), apresenta dois componentes: o sensorial e o emocional.

Já o termo nocicepção refere-se à recepção do estímulo nocivo e apresenta apenas o componente sensorial. Os receptores da dor (nociceptores) na pele e outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor, a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (Dickenson, 1997). Sendo assim, enquanto a dor representa uma percepção subjetiva com uma dimensão emocional, a nocicepção consiste na recepção dos estímulos pelos nociceptores que codificam sinais para fornecer informações ao SNC da existência da lesão (Julius e Basbaum, 2001). Ou seja, o termo nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas por

estímulos nocivos. Já a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (Loeser e Melzack, 1999, Almeida *et al.*, 2004).

A dor pode surgir com a ativação de nociceptores periféricos, gerando um potencial de ação; ou pela liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, ou por diminuição no limiar da resposta da fibra nociceptiva e nociceptores circundantes, induzindo a sensibilização dos nociceptores. Além disso, nociceptores silenciosos, os quais normalmente não são ativos, são recrutados após algum dano tecidual e pode então, responder a uma variedade de estímulos. Uma vez ativados, estes nociceptores previamente silenciosos se tornam sensibilizados e respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa e o mesmo estímulo produz mais dor (Dray e Bevan, 1993, Julius e Basbaum, 2001, Loeser e Melzack, 1999, Guyton e Hall, 2002). Ocorre então um aumento da sensibilidade à dor, clinicamente denominada de hiperalgesia, ou “dor anormalmente intensa, produzida por estímulos que normalmente produzem dor”, ou seja, “o aumento da sensibilidade à dor”, que é normalmente decorrente de importantes mudanças inicialmente no processo periférico e posteriormente, no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodinia, que é um fenômeno similar ao de sensibilização das fibras nociceptivas frente a um estímulo não lesivo ou doloroso (“dor em resposta a um estímulo não nociceptivo”). A alodinia é mediada pela ativação periférica de receptores sensíveis ao estímulo tátil que ganham acesso ao processamento nociceptivo central. (Millan, 1999, Loeser e Treede, 2008, Sandkuhler, 2009).

1.4) Dor Inflamatória

É frequente um processo inflamatório estar relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção. A dor associada a processos inflamatórios é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes (nociceptores), cujos corpos celulares estão localizados no gânglio dorsal, perto da medula espinhal (Battaglia e Rustioni, 1988), como discutido anteriormente.

A inflamação aguda pode ser caracterizada por sinais cardinais clássicos, descritos por Cornelius Celsius (30 AC): rubor e tumor com calor e dor, podendo

ainda apresentar um quinto sinal, a perda de função, acrescentado por Virchow (1821-1902) (Rocha e Silva, 1978). Esses sinais cardinais surgem como consequência das alterações do microambiente da área lesada, devido a liberação de vários mediadores químicos nesta área, muitas delas sendo neuroativas. Estas substâncias estimulam nociceptores quimiossensíveis, levando ao desenvolvimento da dor inflamatória. Íons potássio, íons hidrogênio e trifosfato de adenosina (ATP), liberadas pelas células lesadas, juntamente com a bradicinina (BK) são as substâncias endógenas que produzem efeito excitatório, outras substâncias agem principalmente via sensibilização. A sensibilização diminui o limiar de despolarização dos nociceptores, consequentemente tornando-o responsivo a uma intensidade menor de estímulo. Além disso, fibras sensitivas terminais são protegidas pelo perineuro, que isola o tecido endoneural, prevenindo a passagem de moléculas grandes e moléculas hidrofóbicas como os peptídeos. No local da inflamação essas barreiras são interrompidas, permitindo o acesso destes peptídeos (Coutaux et al., 2005).

Assim, a dor inflamatória pode ser produzida por fenômenos independentes ou interdependentes. Alguns podem agir através da estimulação direta de nociceptores, e outros dependem de mediadores que agem em tipos específicos de nociceptores ou então produzem modificações na via nociceptiva central. Quando há lesão tecidual e instala-se a reação inflamatória, vários mediadores químicos são liberados, e muitos deles participam direta ou indiretamente na nocicepção e na hiperalgesia. A dor inflamatória é, pois, resultado de uma complexa inter-relação de sistemas que estão envolvidos na inflamação. Sistemas enzimáticos prostanoídes (Schaible e Schmidt, 1988, Birrell *et al.*, 1991, Dray, 1995), fator de agregação plaquetária - PAF, (Morita et al., 2004) e cininas (Levine et al., 1986, Dray, 1997) interagem com fatores de crescimento, interleucinas, fator de crescimento neural (Dray e Bevan, 1993, Dray, 1995, Ferreira, 1993), células, entre elas: PMN, macrófagos, linfócitos, além de produtos neuronais como neuropeptídeos (Dray, 1995), de fibras nervosas pós-ganglionares do simpático e nociceptores (Ferreira, 1993, Levine et al., 1986). Todos estes sistemas interagem com a função de proteger e imobilizar o tecido lesado, até que a causa da lesão seja definitivamente eliminada e o tecido restaurado. Enquanto não ocorre a resolução deste processo inflamatório, os sinais cardinais da inflamação persistem.

A amplificação do sinal nociceptivo é produzida não somente pelas substâncias liberadas no local da inflamação, mas também pelas fibras adjacentes ativadas ou sensibilizadas, em particular via reflexo axônico: fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. Desta forma, a fibra aferente primária contribui para a “sopa inflamatória” liberando neuropeptídeos. Este conjunto de interações neuroquímicas é a base da hiperalgesia, ambos originários do dano tecidual (hiperalgesia primária) e ao redor do tecido saudável (hiperalgesia secundária) (Coutaux et al., 2005).

Sendo assim, existem várias fontes importantes onde mediadores que participam da resposta nociceptiva são gerados: no tecido lesado, no sistema vascular, células imunes, tecidos adjacentes, nervos sensoriais e simpáticos. Esses mediadores atuam em receptores amplamente distribuídos no organismo. Alguns destes receptores são acoplados a proteína G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons (Dickenson e Besson, 1997).

Para melhor compreensão dos mediadores inflamatórios, seus efeitos e suas características, foram resumidos na tabela a seguir:

Tabela 1- Mediadores inflamatórios, tabela modificada de (Pereira, 2006)

Mediador Inflamatório	Ação sobre os nociceptores	Características e Efeitos	Referências Bibliográficas
Substância P	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgesia direta e indireta por atuação em receptores NK-1, sinergismo com o glutamato	(Furst, 1999) (Lofgren et al., 1999) (Turnbach e Randich, 2002) (Carlton et al., 1998) (Teoh et al., 1996)
Prostaglandinas	Sensibilização e/ou Ativação	Hiperalgesia em modelos de dor inflamatória e neuropática sensível aos inibidores da ciclooxigenase	(Vane, 1971) (Malmberg e Yaksh, 1995) (Yang et al., 1996) (Hay et al., 1997) (Syriatowicz et al., 1999) (Tonai et al., 1999) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004)
NO	Sensibilização	Indução de analgesia ou hiperalgesia, dependente da concentração.	(Okuda et al., 2001) (Doursout et al., 2003) (Sousa e Prado, 2001)
Bradicinina	Ativação e/ou sensibilização	Hiperalgesia mediada por receptores B2 constitutivos e B1 induzidos, além do aumento da síntese de outros mediadores em modelos de dor aguda e crônica (neuropática). Sensibilização de receptores TRPV1	(Dray, 1997) (Steranka et al., 1988) (Lopes et al., 1995) (Lopes et al., 1993) (Andreeva e Rang, 1993) (Marceau et al., 1998) (Ni et al., 1998) (Dray e Bevan, 1993) (Mathis et al., 1996) (Austin et al., 1997) (Ferreira et al., 1993)
NGF (fator de crescimento neural)	Sensibilização	Modulação da expressão gênica de nociceptores, sensibilização de receptores TRPV1	(Winkelstein, 2004) (Marchand et al., 2005)
Citocinas pró-inflamatórias: interleucina (IL) - 1β, IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF) -α	Sensibilização	Hiperalgesia em modelos de dor aguda inflamatória e crônica (neuropática).	(Stein et al., 1988) (Cunha et al., 1991) (Fukuoka et al., 1994) (George et al., 2005) (Schafers et al., 2001) (Murphy et al., 1999)

Cunha *et al*, 2005 propuseram uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios na hipernocicepção inflamatória em modelos animais. Em primeiro lugar, o termo hipernocicepção é utilizado por estes pesquisadores ao invés de hiperalgesia ou alodinia para definir a sensibilização de nociceptores. Estes pesquisadores relatam que há similaridades e diferenças qualitativas entre camundongos e ratos em termos de liberação de citocinas por um estímulo inflamatório e mecanismos de ação hipernociceptivos destas citocinas. Fator α de Necrose Tumoral (TNF- α), Interleucina 1 β (IL-1 β) e Quimioatraente para Neutrófilos Induzidos por Citocinas 1/Quimiocina Derivado de Queratinócito (CINC/KC), homólogos de Interleucina 8 (IL-8) humana produzidas por ratos e camundongos, respectivamente, são liberados em ratos e camundongos. Estas citocinas iniciam duas vias básicas de hipernocicepção mecânica inflamatória: a prostanoide e a simpática provavelmente por liberação de Dopamina (DA) (Cunha *et al.*, 1991, Poole *et al.*, 1999, Cunha *et al.*, 2005).

Em ambas as espécies animais, a liberação de prostanoídes é estimulada por IL-1 β . Entretanto, TNF- α estimula ambas as vias em ratos e somente a via das prostaglandinas em camundongos. Já o CINC estimula somente o componente simpático em ratos, enquanto KC estimula ambas as vias hipernociceptivas em camundongos (Cunha *et al.*, 1992, Lorenzetti *et al.*, 2002, Cunha *et al.*, 2005).

Outra diferença entre ratos e camundongos está na participação do sistema de cininas em iniciar a cascata de citocinas na hipernocicepção mecânica. Na hipernocicepção induzida por carragenina em ratos, há um evento recente de ativação do sistema cininas plasmáticas com consequente produção de BK que induz a produção de TNF- α pela ativação de receptores B1 e B2. Em contraste, em camundongos, a hipernocicepção inflamatória mediada pela bradicinina, não depende de citocinas; BK ativa diretamente a liberação de prostaglandinas (PGs) e aminas simpáticas (Cunha *et al.*, 2005).

Em camundongos, a carragenina ativa liberação de duas vias de citocinas: TNF- α e KC. Ambos atuam na liberação de IL-1 β e prostanoídes por IL-1 β . No entanto, KC atua adicionalmente por meio das aminas simpatomiméticas (Dopamina). Além disso, TNF- α pode atuar diretamente na sensibilização dos nociceptores (Cunha *et al.*, 2005).

A Figura 3 resume essa cascata de citocinas em camundongos:

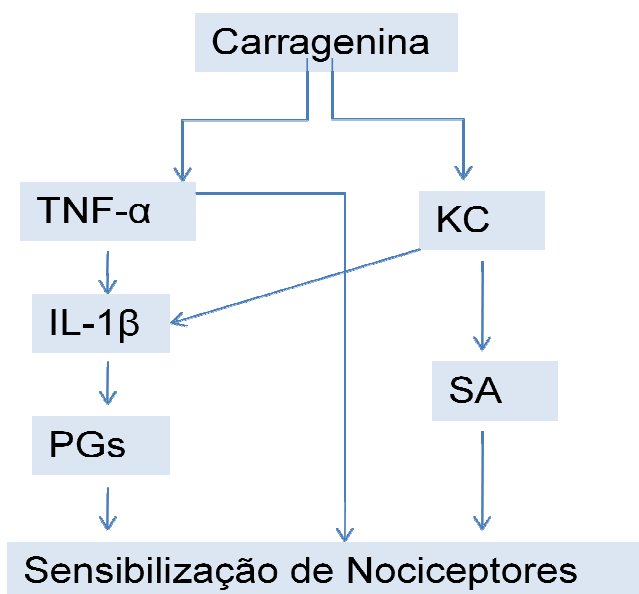


Figura 3. Diagrama modificado de Cunha et al, 2005 Mostra a sequência de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina, intermediada por citocinas e indução final de prostanóides (PGs) e aminas simpáticas (SA).

1.5) Importância da busca de novos analgésicos e das plantas como fonte

Apesar de a dor ser um processo fisiológico importante para a sobrevivência do indivíduo, por representar um sistema de alerta para alterações do organismo, ela é uma sensação desagradável e muitas vezes associada ao sofrimento em diversas patologias. Por isso o homem tem buscado a alteração do curso natural das doenças através do alívio dos sintomas dolorosos, objetivando encontrar analgésicos potentes e com menores efeitos colaterais.

Hoje existem muitas substâncias que são utilizadas no tratamento da dor. Entre elas estão os medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (AINE), opióides, anestésicos locais, antidepressivos tricíclicos e antiepiléticos.

Os AINES agem periféricamente e centralmente por inibição da ciclooxigenase (COX), consequentemente inibindo a síntese de endoperóxidos cíclicos e prostaglandinas, mediadores da resposta inflamatória e hiperalgesia (Barnes e Adcock, 1993, Dannhardt e Kiefer, 2001).

A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada. Ela é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas. A concentração

desta enzima permanece praticamente estável nos tecidos, com pequena elevação de 2 a 4 vezes na sua expressão em resposta à estimulação hormonal ou de fatores de crescimento. Já a COX-2 é induzida em células expostas à agentes pró-inflamatórios como as citocinas, fatores de crescimento e endotoxinas. Apesar de ser primariamente induzida durante processos inflamatórios, a COX-2 pode ser constitutiva no Sistema Nervoso Central e no rim (Vane e Botting, 1995, Pairet e Engelhardt, 1996, Vane e Botting, 1996, Dannhardt e Kiefer, 2001).

Outra isoforma de ciclooxygenase, COX-3, expressa uma sequência intron retidos a partir da transcrição de COX-1. Atualmente, uma hipótese sugere que COX-3 apresenta o mesmo papel na síntese de PGs, em última análise, regulação da dor e febre (Chandrasekharan et al., 2002, Botting, 2003).

PGs são sintetizadas por ação das enzimas COX atuando sobre ácidos graxos essenciais. Estas PGs são mediadores da resposta inflamatória e da nocicepção, que atuam sensibilizando neurônios espinhais da dor. A sensibilização diminui o limiar de despolarização dos nociceptores, tornando-o responsivo a uma intensidade menor de estímulo. A inibição das PGs, por ação de AINEs, portanto, produz analgesia.

Os opióides, que são potentes analgésicos de ação central e também periférica, além de produzir sedação e hipnose, com tendência a produzir dependência e tolerância, agem nos mecanismos inibitórios descendentes, inibe diretamente os terminais nociceptivos ou inibe as sinapses nociceptiva espinhais. Atualmente a administração sistêmica de opióides permanece como o meio mais efetivo de aliviar a dor severa em uma ampla gama de situações que incluem dor aguda, inflamatória persistente e neuropática. Apesar do amplo espectro de ação analgésica, o uso clínico dos opióides é limitado por efeitos colaterais, como depressão respiratória, constipação e dependência física. (Falkenberg, 2007)

Os anestésicos locais agem bloqueando os canais de sódio, impedindo o surgimento do potencial de ação. Desta forma elevam o limiar de excitabilidade, alongam o período refratário efetivo e bloqueiam a despolarização. Isto produz bloqueio da condução nervosa, tanto motora quanto sensorial. Os anestésicos locais são utilizados na dor aguda, por meio de infiltrações locais, mas podem ser utilizadas de forma central com a injeção por punção lombar e infiltração por via epidural ou subaracnóidea. Além disso, podem ser utilizadas também na dor

crônica, principalmente na dor neuropática, neste caso, utiliza-se a via endovenosa, bloqueio nervoso ou aplicação local (Mao e Chen, 2000, Chestnut *et al.*, 2008).

Além destes, vários outros fármacos são usados como analgésicos, particularmente para tratar dores neuropáticas, que respondem mal aos analgésicos convencionais. Neste grupo estão incluídos: antidepressivos tricíclicos como a imipramina e amitriptilina, que atuam no sistema nervoso central inibindo a captura de noradrenalina e os antiepiléticos como a carbamazepina e fenitoína que atuam sobre canais de sódio controlados por voltagem e a gabapentina que age na subunidade $\alpha_2\delta$ do canal de cálcio do tipo L.

Desta forma, ao longo dos anos, a importância da busca de novos analgésicos derivados de produtos naturais, especialmente plantas medicinais se acentua e reside no fato de encontrar novas substâncias que tenham boa potência e que apresentem poucos efeitos adversos (Simões, 2007).

A importância histórica das substâncias ativas obtidas das plantas como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos é representada pelo surgimento de novos grupos de compostos, além de proporcionar a identificação de uma nova possibilidade de tratamento terapêutico. As opções de intervenções terapêuticas seriam muito escassas se não fossem a descoberta dessas substâncias ativas provenientes de plantas medicinais (Simões, 2007).

Para que possam ser preparadas monografias oficiais sobre plantas medicinais é indispensável estabelecer conhecimento botânico, agrônômicos, químicos, farmacológicos e toxicológicos. Apenas após estes estudos é possível, por questões éticas e lógicas, pensar em ensaios clínicos. Numa época em que as exigências de segurança, eficácia e qualidades estabelecidas pelas agências regulamentadoras de medicamentos se tornaram mais rígidas, a permanência ou entrada no mercado destes produtos estão relacionadas com o desenvolvimento de estudos de tecnologias apropriadas para a produção de extratos vegetais e, especialmente, de ensaios clínicos (Simões, 2002).

É estimado que cerca de 30% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas. Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial nos últimos anos do uso de fitofármacos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças. Nos Estados Unidos, 24% das prescrições médicas utilizam um ou mais

princípios ativos derivados de plantas e 2,5% utilizam o seu extrato bruto (Calixto et al., 1998).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), devido a pobreza e a falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 70% a 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais como um primeiro tratamento de saúde (Calixto, 2000).

As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcalóides da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (Robbers, Speedie, Tyler, 1996, citados por (Turolla, 2006).

Embora estes dados apontem benefícios do uso de plantas medicinais, devemos tomar algumas precauções em relação ao seu uso, como é preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A ANVISA orienta que os cuidados em relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos (planta medicinal industrializada) sejam os mesmos destinados aos outros medicamentos. Assim preconiza: buscar informações com os profissionais de saúde; informar ao médico qualquer reação desagradável que aconteça enquanto estiver usando plantas medicinais ou fitoterápicos; observar cuidados especiais com gestantes, mulheres amamentando, crianças e idosos; informar ao médico se está utilizando plantas medicinais ou fitoterápicos, principalmente antes de cirurgias; adquirir fitoterápicos apenas em farmácias e drogarias autorizadas pela Vigilância Sanitária; seguir as orientações da bula e rotulagem; observar a data de validade – nunca tomar medicamentos vencidos; seguir corretamente os cuidados de armazenamento; e desconfiar de produtos que prometem curas milagrosas.

Neste estudo, teremos como material de estudo para o desenvolvimento de um potencial analgésico a *Magnolia ovata*. Para tanto, passaremos a uma descrição mais pormenorizada desta planta.

2) *Magnolia ovata*

Magnolia ovata (A. St. - Hil.) Spreng, tem a seguinte classificação taxonômica

Reino: *Plantae*;

Divisão: *Magnoliophyta*;

Classe: *Magnoliopsida*;

Ordem: *Magnoliales*;

Família: *Magnoliaceae*;

Subfamília: *Magnolioideae*;

Gênero: *Magnolia*

Subgênero: *M. subg. Magnolia*

Seção: *M. sect. Talauma*

Subseção: *M. subsect. Talauma*

Espécie: *Magnolia ovata*

A figura 4 apresenta as características desta planta.



Figura 4. Árvore, Flores e Frutos de *Magnolia ovata*

Magnoliaceae é uma família de plantas dicotiledônea pertencente à ordem *Magnoliales*. Inicialmente era composta por 12 gêneros e cerca de 220 espécies. Os maiores gêneros eram: *Magnolia* (80 spp), *Talauma* (50 spp) e *Michelia* (45 spp), diferenciados por seus caracteres vegetativos, florais e frutíferos (Cronquist, 1981, Trinta e Santos, 1996). Atualmente a família possui os seguintes gêneros: *Liriodendron* e *Magnolia*, os gêneros *Michelia*, *Talauma* e demais gêneros, foram

incorporados ao gênero *Magnolia* na nova classificação (Callaway, 1994, Hunt, 1998, Law e Liu, 2004, Treseder, 1978).

Essa família de plantas é largamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e América. É uma família de grandes árvores aromáticas, com muitas espécies usadas na medicina popular (Cronquist, 1981). No Brasil o gênero *Magnolia* é o único nativo, com algumas espécies cultivadas como ornamentais. São reconhecidas 4 espécies brasileiras: *M. amazonica* Ducke, *M. irwiniana* G. Lozano-C., *M. sellowiana* St. Hil. e a *M. ovata* St. Hil. (Lozano-Contreras, 1990).

A *Magnolia ovata* é uma árvore amplamente dispersa pelo país, podendo ser encontrada desde Goiás até o norte do Rio Grande do Sul. Ocorre tanto em regiões de cerrado como de Mata Atlântica, mas sempre em áreas alagadiças, nas matas ciliares e florestas de galeria. A sua preferência por terrenos brejosos rendeu-lhe os nomes populares de pinha-do-brejo, pinheiro-do-brejo, magnólia-do-brejo e canela-do-brejo. Também é conhecida como baguaçu, fruta-de-pau, magnólia-branca, pau-palheta, avaguaçu e pau-pombo. Floresce entre outubro e dezembro, produzindo grandes flores brancas, aromáticas. Os frutos, semelhantes a uma pinha, são secos e quando maduros, expõem as sementes, atraindo um grande número de pássaros. Dessa forma contribui para a manutenção da avifauna local. A madeira é clara e muito usada para a fabricação de caixas. A exploração intensiva tem tornado essa espécie rara em algumas regiões, como a floresta ombrófila do Sul do país. Por ser uma espécie pioneira tem sido recomendada para o reflorestamento de matas ciliares degradadas (Trinta e Santos, 1996, Lorenzi, 2000).

Existem relativamente poucos estudos químicos com espécies de *Magnólia*. Estes estudos mostram que o gênero é quimicamente bastante diversificado, produzindo lignóides, terpenóides, alcalóides e óleo essencial (Tabela 2).

Tabela 2 – Resumo das classes químicas de *Magnólia* spp

Espécie	Alcalóides	Lignóides	Terpenóides	Óleo essencial	Referência
<i>M. betongensis</i>	X	X			(Le Ray et al., 1989)
<i>M. giôï</i>				X	(Dung et al., 1997)
<i>M. gitingensis</i>	X				(Nonato et al., 1990)
<i>M. gloriensis</i>				X	(Haber et al., 2008)
<i>M. hodgsoni</i>	X	X			(Talapatra et al., 1977)
<i>M. mexicana</i>	X		X		(Bucay, 2002)
<i>M. obovata</i>	X		X		(Plantinet et al., 1985); (Vieira et al., 1998)
<i>M. ovata</i>	X	X	X	X	(Hoffmann et al., 1977); (Stefanello e Alvarenga, 1997); (Stefanello et al., 2002); (Stefanello et al., 2005)

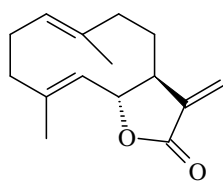
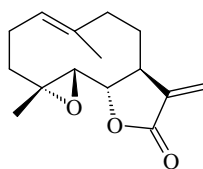
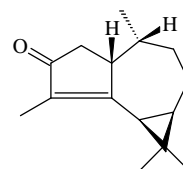
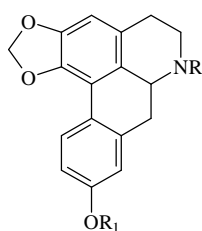
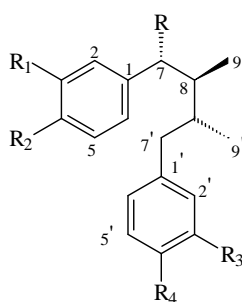
Em algumas populações de *M. ovata* predominam neolignananas nas cascas do tronco enquanto que em outras predominam sesquiterpenos (Stefanello, 2005).

Estudos farmacológicos também são escassos neste gênero. A espécie mais estudada é *M. mexicana*, cujo uso como cardiotônico tem sido comprovado (Bucay, 2002). O extrato etanólico das folhas de *M. hernandezii* mostrou atividade

antioxidante (Puertas et al., 2005). Sobre a *M. ovata*, além do trabalho pioneiro sobre a suposta atividade antidiabética (Morato et al., 1989), há um estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas (Apel et al., 2006) e um outro sobre a atividade inseticida do extrato em hexano dos galhos (Morato et al., 1989, Coelho et al., 2006). Morato et al. demonstraram que as folhas não apresentam atividade antidiabética, mas mostrou que a planta possui atividade colinérgica e elevada toxidez, relacionadas à presença de alcalóides e saponinas.

As folhas de *M. ovata* St. Hil. (Magnoliaceae), são empregadas na medicina popular contra diabetes e a casca do tronco é considerada febrífuga (Mors et al., 2000). Compostos com ação antiinflamatória como sesquiterpenos, alcalóides e neolignanas já foram isolados da casca dessa espécie (Stefanello e Alvarenga, 1997, Stefanello et al., 2002).

Das cascas do tronco de *M. ovata* derivam as lactonas sesquiterpênicas costunolideo (1) e partenolideo (2), o sesquiterpeno ciclocolorenona (3), os alcalóides anolobina (4) e xilopina (5), na forma acetilada (4^a e 5^a, respectivamente) e as neolignanas: ácido diidroguaiarético (6), austrobailignana-6 (7), austrobailignana-5 (8), oleiferina-C (9), acetil-oleiferina-C (10), oleiferina-F (11), acetil-oleiferina-F (12) e acetil-oleiferina-G (13) (Figura 5).

**1****2****3****4-** R = R₁ = H**4^a** – R = R₁ = COCH₃**5-** R = H; R₁ = CH₃**5^a** – R = COCH₃; R₁ = CH₃**6-** R = H; R₁ = R₃ = OMe; R₂ = R₄ = OH**7-** R = H; R₁ - R₂ = OCH₂O; R₃ = OMe; R₄ = OH**8-** R = H; R₁ - R₂ = R₃ - R₄ = OCH₂O**9-** R = OH; R₁ - R₂ = R₃ - R₄ = OCH₂O**10-** R = OAc; R₁ - R₂ = R₃ - R₄ = OCH₂O**11-** R = R₄ = OH; R₁ - R₂ = OCH₂O; R₃ = Ome**12-** R = OAc; R₁ - R₂ = OCH₂O; R₃ = OMe; R₄ = OH**13-** R = H; R₁ = R₂ = R₃ = Ome; R₄ = OH**Figura 5.** Substâncias previamente isoladas das cascas do tronco de *M. ovata*.

A partir do extrato etanólico das cascas de *M. ovata*, podem ser extraídos uma fração por partição com diclorometano e uma fração rica em xilopina, obtida por extração ácida da fração precedente. Como a xilopina é um composto instável, oxida-se com facilidade em condições normais, foi realizada a conversão da xilopina em um derivado mais estável: a N-acetil xilopina.

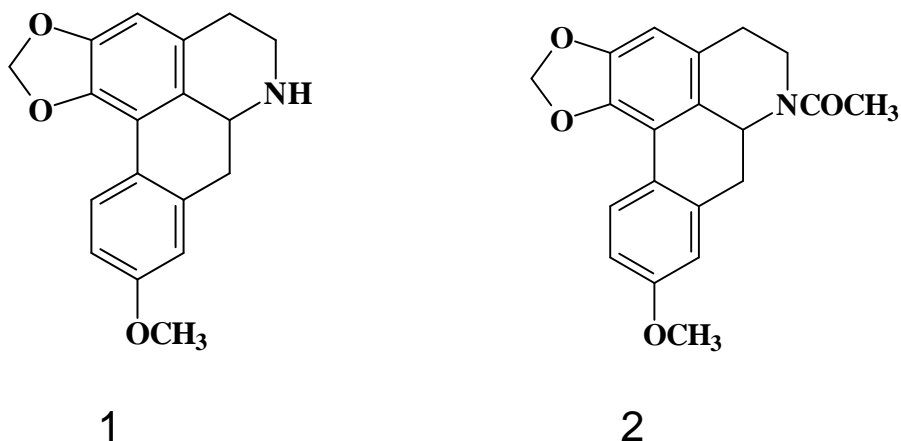


Figura 6. Estrutura química da xilopina (1), isolada de *Magnolia ovata* e N-acetil xilopina (AXIL) (2).

Recentemente nosso grupo de pesquisas mostrou que o EEMO possui atividade antiinflamatória e antipirética, confirmando assim o uso na medicina popular como antipirética (Kassuya et al., 2009)

Pelo fato de várias substâncias que possuem atividade antipirética compartilharem o efeito analgésico, como é o caso dos AINEs, nós propusemos estudar se a *M. ovata* (EEMO e AXIL) possui atividade analgésica, além da atividade antipirética e antiinflamatória já descrita por Kassuya et al (2009).

3) OBJETIVOS

3.1) Objetivo Geral

Avaliação da atividade antinociceptiva do EEMO e da AXIL, um derivado do composto isolado (xilopina) de *Magnolia ovata*. Ainda, procuramos desenvolver os estudos iniciais para a determinação do possível mecanismo de ação da AXIL

3.2) Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antinociceptivo do EEMO e AXIL, obtidos das cascas dos troncos de *M. ovata* em modelos de nocicepção química (testes do ácido acético e formalina) em camundongos por tratamento sistêmico;
- Avaliar o efeito antinociceptivo do EEMO e AXIL em modelo de nocicepção térmica (modelo da placa quente) em camundongos por tratamento sistêmico;
- Avaliar o efeito antihiperalgésico do EEMO e AXIL em modelo de hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em camundongos por tratamento sistêmico;
- Avaliar o efeito do EEMO e AXIL sobre o desempenho motor de camundongos;
- Avaliar o efeito local da AXIL na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina em camundongos;
- Avaliar o(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no efeito antinociceptivo da AXIL por administração local de mediadores inflamatórios como: BK, IL-1 β , TNF- α , Prostaglandina E₂ (PGE₂), Dopamina (DA) e CINC-1

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços machos (25-35 g) proveniente do Biotério do Setor de Ciências Biológicas e mantidos em salas de aclimação do Laboratório de Inflamação, Dor e Febre do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os animais foram retirados da sala de aclimação e mantidos no laboratório de experimentação para adaptação por um período de pelo menos 1 h antes do início dos experimentos e foram utilizados somente uma vez em cada teste. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (processo nº 23075.039372/2007-32, Nbr. 271). Além disso, o presente estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes atuais para os cuidados com os animais de laboratório e orientações éticas para a investigação de dor experimental em animais conscientes de acordo com (Zimmermann, 1983), seguindo as orientações do Instituto Nacional de Saúde (E.U.A.).

O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo foram os mínimos necessários para mostrar os efeitos das drogas testadas.

4.2) Material Botânico, preparação do extrato, fracionamento, isolamento e identificação do composto ativo

Magnolia ovata A. St. Hil. (*Magnoliaceae*) foi coletada em Outubro de 2003 em Santos Dumont, Minas Gerais, Brasil. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade de São Paulo (R. Mello-Silva, 2168).

A responsável pela obtenção do EEMO e também pelo isolamento, separação e identificação da AXIL foi a Professora Dra Maria Élide A. Stefanello do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Sucintamente, troncos secos e pulverizados de *M. ovata* (424 g) foram extraídos à temperatura ambiente sucessivamente com hexano ou etanol. O solvente foi removido sob baixa pressão, rendendo um extrato bruto em hexano (1,5 g) e etanol (EEMO; 22,5 g).

Uma parte do EEMO (10,0 g) foi dissolvida em etanol:água (1:1) e foi feita uma partição com diclorometano. A fase diclorometano foi separada e o solvente evaporado, rendendo 1,54 g de resíduo (fração diclorometano).

Da fração diclorometano, uma porção (1,00 g) foi dissolvida em diclorometano e então realizada partição com 2% de ácido clorídrico. A fase aquosa foi separada, basificada com hidróxido de amônia e feito nova partição com diclorometano. A fase orgânica, depois de removido o solvente, rendeu uma mistura de alcalóides (0,067 g). Esta fração foi analisada por cromatografia de camada delgada (CCD), usando placas de sílica gel (Merck 0,25 mm) e desenvolvida com diclorometano:metanol (3:0,5). A placa foi observada com luz ultravioleta e os *spots* foram detectados com o reagente de Dragendorff. Quatro *spots* foram observados ($R_f = 0.47, 0.40, 0.31, \text{ e } 0.23$) usando o reagente de Dragendorff. O espectro na Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio ($^1\text{H-NMR}$) foi realizado para esta fração. Análises dos dados dos espectros e comparação com a literatura (Roblot et al., 1983), demonstraram a xilopina (1) (Figura 2) como o alcalóide em maior quantidade na mistura (fração rica em xilopina ou F2).

Uma porção de F2 (0,050 g) foi acetilada com ácido acético anidro e piridina, seguindo um trabalho usual. O produto obtido (0,054 g) foi sujeito a cromatografia de camada delgada e desenvolvido com hexano:diclorometano:acetona (3:5:2), rendendo um pó branco (0,0072 g), que foi identificado por $^1\text{H-NMR}$ como AXIL (2) (Figura 2) por comparação com dados prévios obtidos (Stefanello e Alvarenga, 1997) e avaliação da literatura (Nonato et al., 1990). Este rendimento da AXIL foi utilizado para os cálculos das doses a serem utilizadas nos testes *in vivo*, enquanto que as doses de EEMO utilizados foram baseadas em estudos anteriores (Kassuya et al., 2009).

Não foi possível isolar outros compostos, que foram provavelmente decompostos durante o isolamento. O rendimento descrito acima foi usado para calcular da faixa de dose de EEMO e AXIL usados nos experimentos *in vivo*.

Espectros de NMR foram obtidos pelo espectrofotômetro Brucker (AC-200), usando CDCl_3 (clorofórmio deuterado) como solvente e tetrametilsilano como referência interna.

4.3) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva

4.3.1) Teste das contorções abdominais induzidos pelo ácido acético

Este teste permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam em nível central ou periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,8 % v/v) diluído em solução salina (Sal, 0,9 % de NaCl). Grupos de camundongos foram pré-tratados por via oral com EEMO (10-100 mg/kg), AXIL (0,015-0,15 mg/kg) ou indometacina (5 mg/kg, controle positivo) 1 hora antes da injeção de solução de ácido acético. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (Tween 80 0,1%, 10 mL/kg) utilizado para diluir os extratos e compostos. Após a injeção de ácido acético os camundongos foram colocados sob funis de vidro invertido com espelho ao fundo e foram observados para a contagem do número de contorções cumulativamente durante 20 minutos.

As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores de acordo com o método descrito anteriormente (Bentley et al., 1981).

4.3.2) Nocicepção induzida pela formalina

Uma hora antes da indução da nocicepção induzida pela administração de formalina 2,5% na pata, os animais receberam por via oral o EEMO (100 mg/kg; 30 mg/kg ou 10 mg/kg), ou AXIL (0,15 mg/kg; 0,045 mg/kg ou 0,015 mg/kg), ou somente veículo (0,1% de Tween 80) (10 mL/kg).

O procedimento foi realizado conforme descrito por (Hunskar et al., 1985). Os animais foram colocados individualmente em plataformas de observação transparentes (sob funil de vidro invertido com espelho ao fundo) por um período

de adaptação de no mínimo 20 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção intraplantar (i.pl.) contendo 20 µl de solução de formalina a 2,5 % (0,92 % de formaldeído) na pata posterior direita. Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados nas plataformas de observação. O comportamento nociceptivo avaliado foi o tempo em que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou elevando a pata injetada com formalina. Este comportamento nociceptivo foi observado durante 30 min, cronometrados de 5 em 5 minutos. Este comportamento durante este período de observação é considerado indicativo de nocicepção. Este modelo é bifásico, o que permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase (Fase I), que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina, caracterizada pelo estímulo direto da formalina no nociceptor (dor de origem neurogênica) e a segunda fase (Fase II), que consideramos ser o tempo entre 15 a 30 min após a formalina, que representa a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória. Apenas a fase inflamatória está relacionada à liberação de mediadores inflamatórios.

4.3.3) Hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Cg)

Neste modelo, é necessária a determinação do limiar mecânico basal, que é realizada com a avaliação do limiar nociceptivo por estimulação mecânica, no dia anterior a realização do experimento, para determinar o limiar de sensibilidade mecânica dos animais sem nenhum tratamento. No dia do experimento, os animais foram tratados por via oral (v.o) com EEMO (10-100 mg/kg, v.o.), AXIL (0,015-0,15 mg/kg, v.o.) ou veículo (Veic, Tween 80, 0,1%) 1 hora antes da injeção i.pl de 20 µL (pata posterior direita) de carragenina (300 µg/pata).

Além do tratamento v.o., grupos distintos de camundongos receberam na pata ipsilateral a carragenina (pata posterior direita) a AXIL (0,03-300 ng/pata) ou na pata contralateral (pata posterior esquerda, 3 ng/pata de AXIL) 30 minutos antes da injeção de carragenina. Neste protocolo utilizamos somente o composto isolado, pois a mistura de compostos presentes no extrato bruto poderia causar danos aos tecidos. A fim de avaliar se o efeito observado da administração do composto foi local, excluindo a possibilidade de um efeito sistêmico. Em outro protocolo administramos o composto isolado na pata contralateral àquela que recebeu carragenina.

A avaliação do limiar de sensibilidade mecânica ou hiperalgesia foi realizada pelo método de *up and down* (Chaplan et al., 1994), utilizando filamentos de von Frey antes (basal) e após a injeção (1-4 horas).

Os camundongos foram colocados em caixas com uma das faces transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame, possibilitando o acesso à pata traseira do animal dos filamentos de von Frey. Após a climatização dos animais (em torno de 2 a 3h), foram utilizadas uma série de filamentos de 0,008 a 6,0 g aplicados em ordem crescente ou decrescente para determinar 50% do limiar de retirada da pata (limiar 50%) (Dixon, 1991). O primeiro filamento da série testado foi sempre o de 0,4 g na pata posterior direita. Eram realizadas 6 avaliações com intervalos de 10 segundos. A ausência de resposta com um determinado filamento levou à utilização de outro filamento de maior massa e assim sucessivamente. Havendo retirada ou lambida da pata pelo animal, um filamento de menor massa foi aplicado após um intervalo de 2 min. O limiar de retirada da pata (50% do limiar) foi calculado de acordo com Dixon (Dixon, 1991), Representada pela seguinte equação:

$$\text{Limiar 50\%} = 10^{\left[\log \text{ do último filamento} \pm (\text{valor da tabela (Dixon, 1980)} \times 0,4)\right]}$$

4.3.3.1) *Estudo dos mecanismos dos efeitos antinociceptivos da N-acetil xilopina*

Para o estudo do(s) possível(is) mecanismo(s) envolvido(s) no(s) efeito(s), AXIL (3 ng/pata posterior direita) foi administrado 15 minutos antes da injeção dos mediadores da resposta à dor inflamatória que induzem nocicepção. Os mediadores injetados na mesma pata em que foi injetada AXIL foram: BK (500 ng/pata); IL1 β (0,5 pg/pata); TNF- α (1 pg/pata); PGE2 (100 μ g/pata); DA (10 μ g/pata); CINC-1 (100 pg/pata), (Cunha et al., 2008).

Como controle foi injetado na pata contralateral o veículo na dose de 20 μ l na pata. A avaliação da alodinia foi realizada 3 horas após a administração dos agentes nociceptivos (Cunha et al., 2008), utilizando o método descrito.

4.3.4) Teste da placa quente

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar o tempo de latência sobre a placa aquecida de acordo com o método descrito anteriormente por (Eddy e Leimbach, 1953), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa quente foi mantido a $54 \pm 1^\circ\text{C}$. Grupos de camundongos foram tratados via oral com EEMO (30 mg/kg), AXIL (0,15 mg/kg) ou fentanil (100 $\mu\text{g/Kg}$ s.c.) como controle positivo e, após 1 hora para o extrato ou AXIL ou 15 min para o fentanil, os animais foram colocados em um cilindro de vidro com 24 cm de diâmetro, sobre a superfície aquecida. O tempo decorrido entre a colocação do animal e o aparecimento das reações de balançar ou lambear as patas, ou ainda de subir na parede do cilindro foi registrado e considerado como índice de latência. Um tempo máximo de 30 s foi utilizado para prevenir possíveis danos teciduais (tempo de corte). Cada animal foi testado antes da administração das drogas a fim de obter uma resposta basal (latência basal) e foram utilizados somente animais que responderam à placa dentro de 15 segundos.

Os valores de tempo de latência foram dados em % MPE (% Máximo de Efeito Possível), calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{MPE} = (\text{latência pós-droga} - \text{latência basal} / \text{tempo de corte} - \text{latência basal}) \times 100$$

4.4) Efeito sobre o desempenho motor (“rota-rod”)

A avaliação do desempenho motor permite uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade antinociceptiva. Portanto, drogas que promovem relaxamento ou sedação alteram o desempenho motor e podem interferir na resposta, sem serem necessariamente antinociceptivas.

Esse teste foi desenvolvido de acordo com o método de (Dunham e Miya, 1957) e o desempenho motor do animal foi medido no aparelho “rota-rod” (mod. DS 37; Ugo Basille). Foram utilizados três grupos contendo de 8 a 10 camundongos, sendo computado o tempo basal de permanência (em segundos)

na barra giratória de, no máximo, 3 minutos (tempo de corte). Uma hora antes do teste, um grupo de animais recebeu veículo (Veic; 10 mL/kg; v.o.), um grupo controle positivo foi tratado com Diazepam (5 mg/kg; s.c. 15 min antes do teste) e os outros grupos de animais receberam EEMO (100 mg/kg; v.o.), ou AXIL (0,15 mg/kg v.o.). O tempo foi cronometrado imediatamente após a administração das substâncias aos animais (tempo zero), avaliando-se a ocorrência de mudanças em seu desempenho motor. O resultado foi dado pela média de tempo em segundos de permanência de cada grupo no aparelho.

4.5) Drogas e Reagentes

Carragenina, indometacina, fentanil, diazepam, prostaglandina E₂, bradicinina, cloridrato de dopamina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO - E.U.A.). Interleucina-1 β , Fator α de necrose tumoral, CINC-1 foram adquiridos da R & D Systems, E.U.A. Formalina foi adquirida da Merck Sharp & Dohme. O restante dos sais e compostos foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade e eram de grau analítico.

4.6) Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm Erro Padrão da Média (EPM), exceto para os valores das DI₅₀ (dose do extrato etanólico necessárias para reduzir em 50% as respostas nociceptiva em relação ao grupo controle) que foram representados como a média geométrica acompanhada de seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Valores de *P* menores do que 0,05 (*P* < 0,05) foram considerados como indicativos de significância. A concentração dos compostos que produziu 50% do efeito máximo (DI₅₀) foi obtida por cálculos a partir da regressão linear no programa GraphPad Prism Software, San Diego, CA, U.S.A.

5) RESULTADOS

5.1) Efeitos da EEMO e AXIL nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Os resultados descritos na Figura 7 demonstram que o ácido acético induziu um aumento significativo no número de contorções abdominais nos camundongos (aproximadamente 40-50 contorções em 20 min) quando comparado com animais que receberam veículo/salina. A administração v.o. de EEMO (10-100 mg/kg 1 hora antes) inibiu de maneira dose-dependente o número de contorções abdominais em camundongos. Foi calculado um valor de ID_{50} (dose inibitória média) (limite de confiança 95%) de 18,7 (7,15-48,85) mg/kg e uma inibição máxima de $91 \pm 9\%$. De uma forma similar, a administração oral de AXIL (0,015-0,15 mg/kg) inibiu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético com inibição máxima de $50 \pm 11,2\%$. A indometacina, droga utilizada como controle positivo inibiu $54 \pm 16\%$ na dose de 5 mg/kg o número de contorções abdominais.

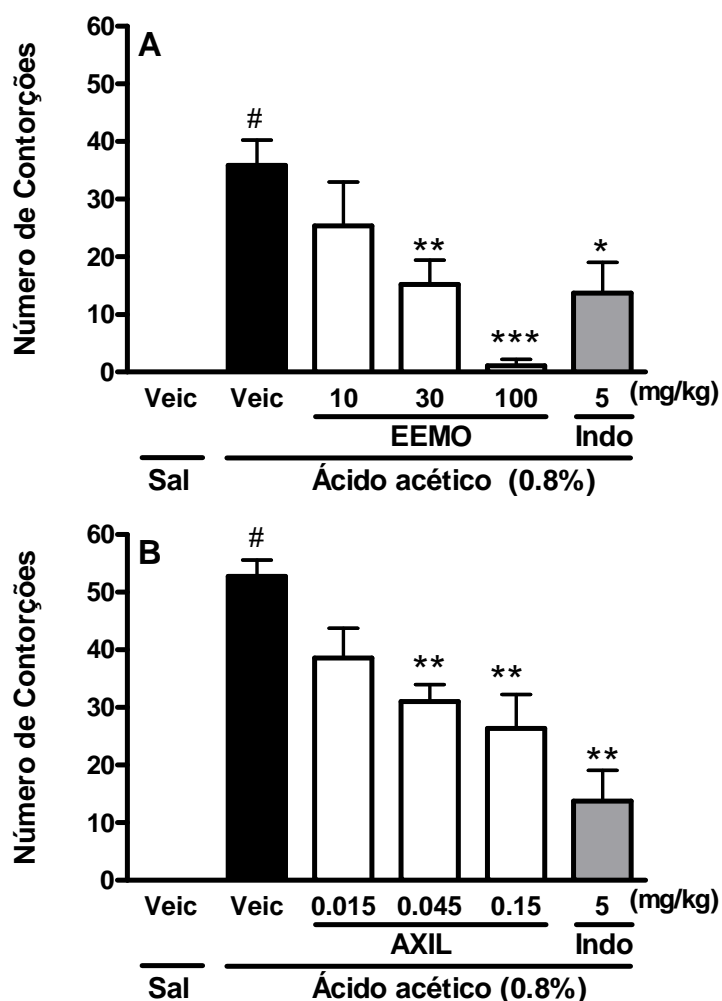


Figura 7. Efeito do EEMO (A) e da AXIL (B) nas contorções abdominais em camundongos induzidas pelo ácido acético. Os animais receberam EEMO (10-100 mg/kg), AXIL (0,015-0,15 mg/kg), indometacina (Indo, 5 mg/kg) ou veículo (Veic) por via oral 1 h antes de receber solução de ácido acético 0,8% ou salina (Sal) por via i.p. As barras representam a média \pm E.P.M. do número de contorções abdominais avaliados em 20 min (6 a 8 animais/grupo). Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima das barras mostram as diferenças significativas em comparação com o grupo Veic/Sal (# $p < 0,001$) ou com em relação ao grupo Veic/Ácido acético (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.2) Efeitos do EEMO e AXIL na nocicepção induzida pela formalina

Os resultados descritos na Figura 8 demonstram que a formalina induz comportamento nociceptivo aferido como tempo de lambida e elevação da pata por aproximadamente 100 segundos na primeira fase - neurogênica (primeiros 5 minutos após aplicação de formalina) e aproximadamente 200 segundos na segunda fase - inflamatória (de 15 a 30 minutos após a injeção de formalina) quando comparado com os animais que receberam veículo/salina.

As Figuras 8A e 8C mostram o curso temporal do efeito do tratamento dos animais com EEMO e AXIL, respectivamente, no comportamento nociceptivo induzido por formalina. Os resultados cumulativos de cada tratamento (EEMO e AXIL) também são mostrados logo abaixo, separadamente em fase I (0-5 min) e em fase II (15-30 min).

As figuras 8B e 8D mostram que EEMO (10-100 mg/kg, v.o.) e AXIL (0,015-0,15 mg/kg, v.o.), respectivamente, inibiram de forma significativa a fase inflamatória (Fase II) da nocicepção induzida pela formalina com inibição máxima de $87 \pm 4\%$ para EEMO e $71 \pm 10\%$ para AXIL. Não houve diferença significativa na fase neurogênica (Fase I) entre os grupos EEMO ou AXIL quando comparados ao grupo controle.

Figura 8. Efeito do tratamento oral dos animais com EEMO e AXIL sobre o comportamento nociceptivo induzido por formalina. Camundongos foram tratados com EEMO (10-100 mg/kg), AXIL (0,015-0,15 mg/kg) ou Veic (Tween 80 0,1%) e receberam injeção i.pl. de 2,5% de solução de formalina ou Sal depois de 1 hora. As figuras A e B mostram o curso temporal do comportamento nociceptivo (tempo de lambida e elevação da pata em s) à formalina frente aos diferentes tratamentos com EEMO (A) e AXIL (C). Abaixo de cada figura, a representação cumulativa do tempo em que os animais apresentaram o comportamento nociceptivo na fase I e II para o EEMO (B) e AXIL (D). Os pontos e as barras representam a média \pm E.P.M. de grupos de 6 a 12 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima das barras mostram as diferenças significativas em comparação com o grupo Veic/Sal (# $p < 0,001$) ou com em relação ao grupo Veic/formalina (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.3) Efeitos de EEMO e AXIL na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina

Na Figura 9 observamos que o limiar de sensibilidade basal dos animais fica em torno de 600 a 800 mg (limiar mecânico 50% aferidos com filamentos de von Frey). Após a injeção de carragenina esse limiar de sensibilidade é reduzido para aproximadamente zero nos animais que receberam veículo/salina.

A injeção i.pl. de 20 µL de carragenina (300 µg/pata) induziu a redução de $98 \pm 1\%$ no nível do limiar mecânico nociceptivo (Figura 9) 3-4 horas após sua injeção (Cunha *et al.*, 2008). A administração oral de EEMO (100 mg/kg) e AXIL (0,15 mg/kg) foi capaz de inibir a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina. A inibição foi de $40 \pm 6\%$ para EEMO e $82 \pm 8\%$ para AXIL (Figuras 9A e 9B, respectivamente).

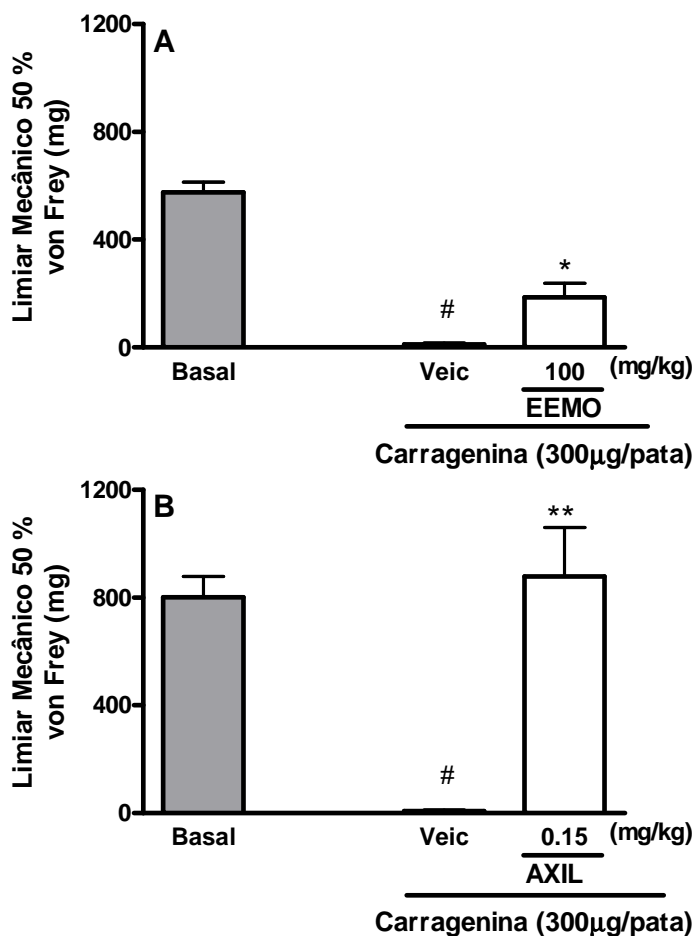


Figura 9. Efeito da EEMO (A) e AXIL (B) na alodinia induzida pela carragenina em camundongos. O limiar mecânico 50% foi avaliado para cada animal (basal) em seguida os animais receberam por v.o. EEMO (100 mg/kg), AXIL (0,15 mg/kg) ou Veic (Tween 80 0,1%). Depois de 1 hora, os camundongos receberam injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata), e o limiar mecânico 50% foi avaliado depois de 4 horas utilizando filamentos de von Frey. Cada barra representa a média \pm E.P.M. de 6 a 12 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima das barras mostram as diferenças estatísticas em comparação como grupo basal (# $p < 0,001$) ou com o grupo Veic/Carragenina (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.4) Efeito da injeção local de AXIL na hiperalgesia induzida pela carragenina

O tratamento i.pl. com AXIL (injeção na pata direita 0,03-300 ng/pata) também reduziu significativamente a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina (Figura 10A e 10B) principalmente entre 3 e 4 horas depois da injeção da carragenina. A Inibição máxima observada foi de $119,5 \pm 24\%$ em 3 horas e $81 \pm 7\%$ em 4 horas.

Adicionalmente quando AXIL foi administrada na pata contralateral a injeção de carragenina (na pata esquerda na dose efetiva de 3 ng/pata), nenhum efeito de inibição da hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina foi observado, ao contrário da redução da hiperalgesia observada quando da administração na pata ipsilateral (pata direita) demonstrada na Figura 10C.

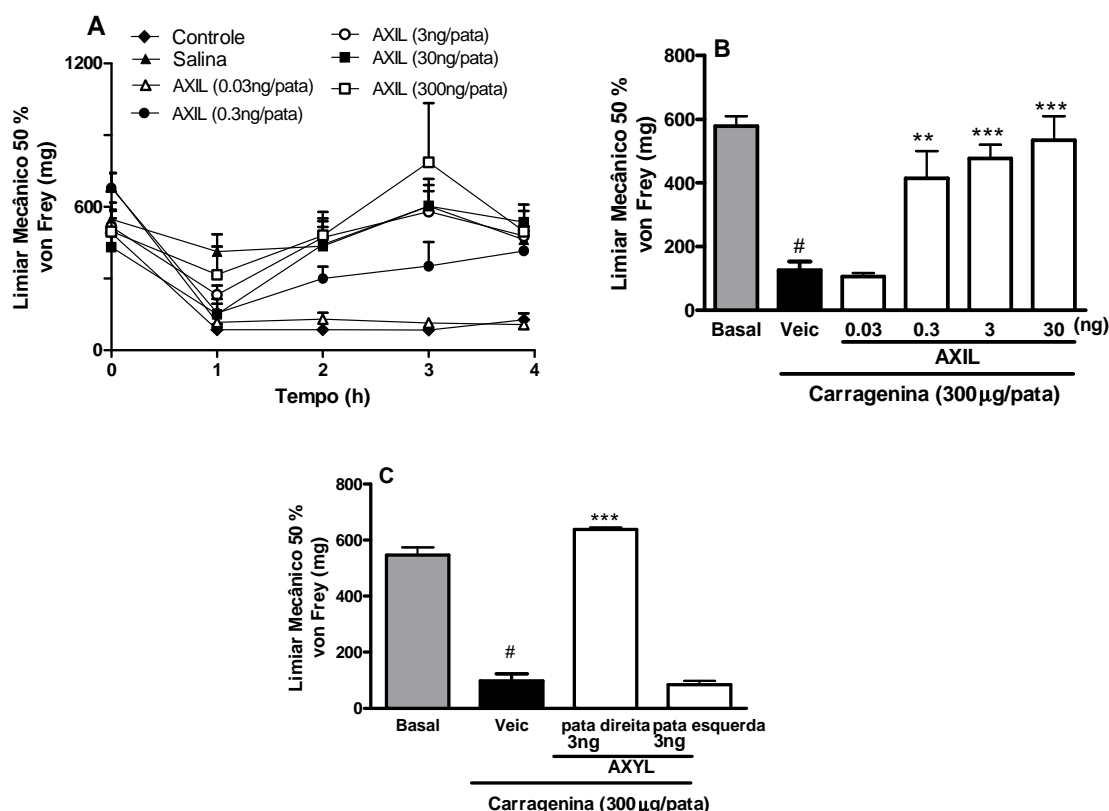


Figura 10. Efeito da administração local de AXIL na hiperalgesia induzida por carragenina em camundongos. O painel A mostra a curva tempo-resposta da administração de AXIL nas doses de 0,03-300 ng/pata. O painel B representa os animais que receberam AXIL (0,03-30 ng/pata) ou Veic 15 minutos antes da injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata). As colunas mostram os efeitos das diferentes doses de AXIL na hiperalgesia induzida pela carragenina em camundongos 3 horas após injeção de carragenina. No painel C, os animais receberam AXIL (3 ng/pata) ou veículo na pata direita (ipsilateral) ou na pata esquerda (contralateral à aplicação de carragenina) na mesma dose. Depois de 15 minutos receberam carragenina (300 µg) na pata direita. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 6-8 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima das colunas denotam a diferença estatística em comparação com o grupo basal (# $p < 0,001$) ou com o grupo Veic/Carragenina (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.5) Efeito do tratamento com EEMO e AXIL no teste da placa quente e no desempenho motor (“rota-rod”)

Os resultados na Figura 11A mostram que EEMO e AXIL, administrados por v.o., na mesma dose que inibiram a nocicepção (100 mg/kg e 0,15 mg/kg respectivamente) não produziram aumento no tempo de latência sobre a placa aquecida à 54°C, ou seja, não apresentou nenhum efeito analgésico, quando comparado com o grupo de animais tratados com veículo. Diferente do controle positivo, fentanil (administrado pela via s.c.) que apresentou aumento significativo na % MPE comparado com os animais tratados com veículo (Figura 11A).

De forma semelhante EEMO e AXIL, administrados por v.o. (nas mesmas doses de inibição da nocicepção: 100 mg/kg e 0,15 mg/kg respectivamente) não afetaram de forma significativa o desempenho motor dos animais testados, quando comparados com os animais que receberam apenas veículo (grupo controle) (Figura 11B). Em contrapartida, os animais do grupo controle positivo, que receberam diazepam (5 mg/kg s.c.) reduziram de forma significativa a coordenação motora no teste do rota-rod (Figura 11B).

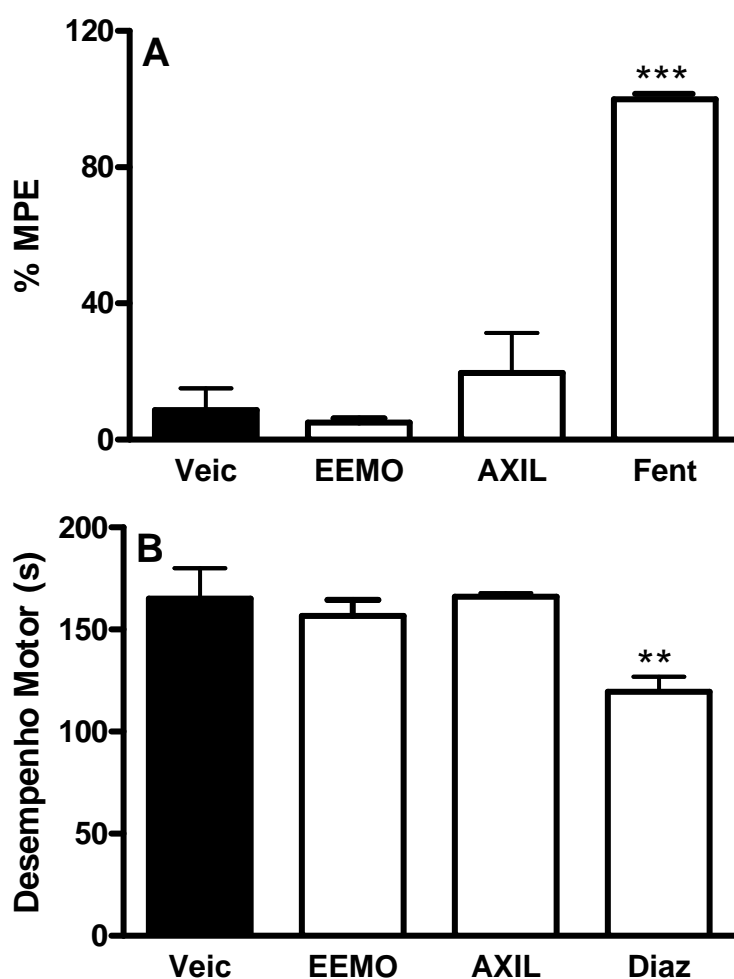


Figura 11. Efeito do tratamento oral com EEMO e AXIL no teste da placa quente (A) e teste do rota-rod (B) em camundongos. Os camundongos foram tratados com EEMO (100 mg/kg, v.o.), AXIL (0,15 mg/kg v.o.) ou Veic e submetidos a estes testes depois de 1h. O grupo controle positivo recebeu fentanil (100 µg/kg S.C. 15 minutos antes do teste) no teste de placa quente ou diazepam (5 mg/kg S.C. 15 minutos antes) no teste do rota rod. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 6-12 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima da barras denotam a diferença significativa estatisticamente em comparação com o grupo basal e os grupos tratados com as drogas ou com o veículo (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5.6) Efeito do tratamento com AXIL local na hiperalgia mecânica induzidas por BK, TNF- α , IL-1 β , e PE-G2

Os resultados na Figura 12 mostram o efeito da AXIL administrada localmente (3 ng/pata) ou Veículo (20 μ L/pata) 15 minutos antes da administração de vários mediadores inflamatórios e nociceptivos e na hiperalgesia mecânica depois de 3 horas.

O limiar de sensibilidade basal dos animais foi de aproximadamente 600 mg (limiar mecânico 50% aferidos com filamentos de von Frey). Após a injeção i.pl. do mediador houve diminuição do limiar de sensibilidade para aproximadamente 100mg para a BK e IL-1 β (Figura 12A e 12C, respectivamente), 150mg para o TNF- α (figura 12B), para 200 mg para a PGE₂ (Figura 12D) ou seja, BK, TNF- α , IL-1 β e PGE₂ i.pl. induzem hiperalgesia mecânica que é observada pela diminuição do limiar de sensibilidade.

Na Figura 12A observamos uma redução significativa da hiperalgesia mecânica pela AXIL (3 ng/pata) administrada 15 min antes da administração de BK (500ng/pata), com uma inibição máxima de $99,94 \pm 3,3\%$. A Figura 12B mostra uma redução de $64,47 \pm 16\%$ na nocicepção induzida pelo TNF- α (1pg/pata) pela administração i.pl. de AXIL 3 ng 15 minutos antes do mediador. A Figura 12C refere-se a inibição da nocicepção induzida pela IL-1 β (0,5 pg/pata) 15 min antes da aplicação de AXIL 3 ng/pata, com inibição máxima de $83,41 \pm 4,1\%$. E a Figura 12D mostra a inibição da hiperalgesia mecânica induzida pela PG-E₂ (100ng/pata) aplicada 15 min depois da AXIL (3 ng/pata), mostrando uma inibição máxima de $81,1 \pm 11,5\%$.

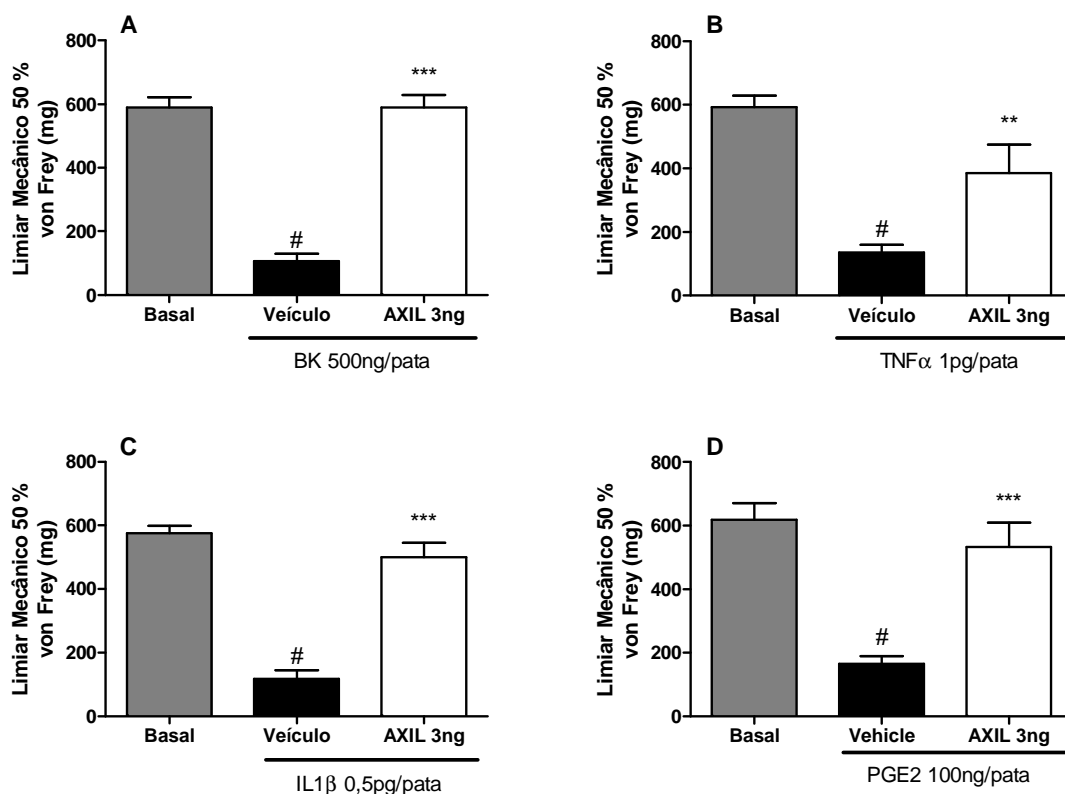


Figura 12. Efeito do tratamento local com AXIL 3 ng ou veículo 15 min antes de BK (500 ng/pata) (A); TNF- α , 1 (pg/pata) (B); IIL-1 β (0,5 pg/pata) (C); e PG-E₂, (100 ng/pata) (D). O limiar de hiperalgesia mecânica 50% foi avaliado 3 horas depois. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 6-12 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os símbolos acima das barras denotam o nível de significância em comparação com o grupo veículo- tratado (**p<0,05 e ***p<0,001) e # indica a diferença em relação ao basal.

5.7) Efeito do tratamento com AXIL local na hiperalgesia mecânica induzidas por CINC-1 e DA.

Na Figura 13 observamos que o limiar de sensibilidade basal dos animais foi de aproximadamente 600 mg (limiar mecânico 50% aferidos com filamentos de von Frey). Após a injeção i.pl. de CINC-1 ou DA houve diminuição do limiar de sensibilidade para aproximadamente 100 mg (Figura 13A e 13B), em animais tratados com o veículo i.pl., ou seja, CINC-1 e DA induziram hiperalgesia mecânica em camundongos, o que é observado pela redução do limiar de sensibilidade.

A Figura 13 demonstra que o tratamento local com AXIL 3ng não modificou a hiperalgesia mecânica induzidas por CINC-1 (100 pg/pata) nem por DA (10 µg/pata), quando aplicado 15 minutos antes dos mediadores e o limiar de sensibilidade aferido após 3 horas.

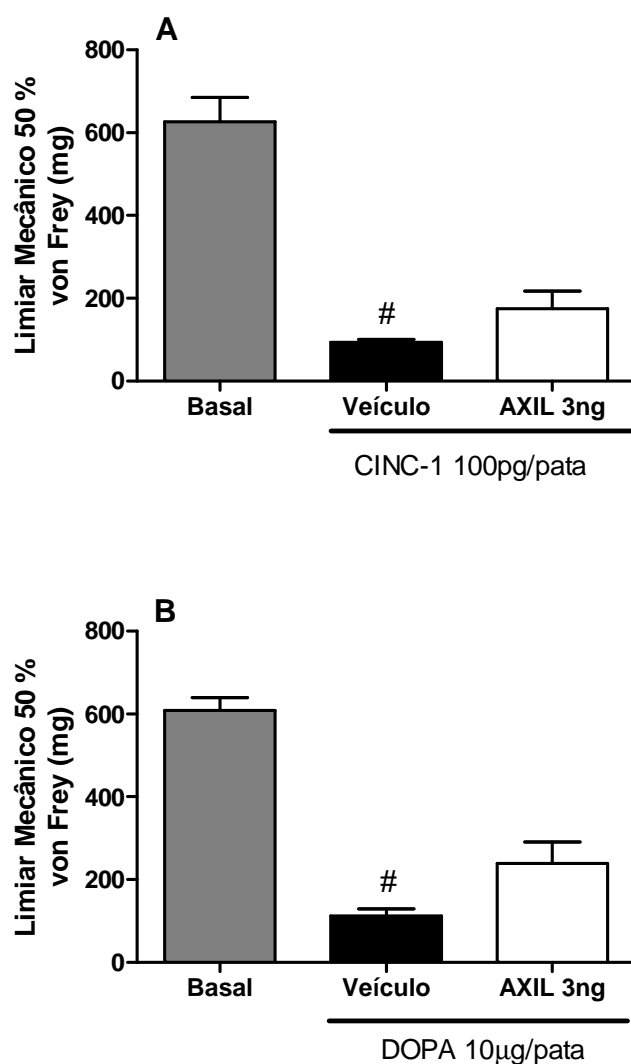


Figura 13. Efeito do tratamento local com AXIL 3 ng ou veículo 15 minutos antes de CINC-1 100 pg/pata (A) e DA 10 µg/pata (B). O limiar de hiperalgesia mecânica foi avaliado 3 horas após. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. de 6-12 animais. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Newman Keuls. Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação com o grupo Veículo-Tratados (** $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$) e # indica a diferença em relação ao basal.

6) DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o tratamento oral de camundongos com extrato etanólico das cascas do tronco de *M. ovata* (EEMO) reduziu a nocicepção induzida por ácido acético, formalina e também reduziu a alodinia mecânica induzida pela carragenina intraplantar. O derivado semisintético AXIL, produzido pela acetilação da xilopina isolada deste extrato da *M. ovata*, também mostrou atividade antinociceptiva quando administrado tanto por via oral quanto localmente. Ambos, EEMO e AXIL foram inefetivos em alterar o tempo de latência sobre a placa aquecida e também não modificaram o desempenho motor dos animais em doses que reduziam a nocicepção. Além disso, é bastante provável que a N-acetil xilopina esteja atuando principalmente periféricamente, não envolvendo ações centrais uma vez que a injeção na pata ipsilateral produziu analgesia e este resultado foi corroborado pelos resultados do teste da placa quente e rota-rod. Essa ação analgésica ocorreu essencialmente no componente dependente de prostaglandinas da sensibilização periférica de nociceptores, por ter inibido a alodinia induzida por bradicinina, TNF- α , IL-1 β e PGE2, mas não no componente simpático, pela não inibição da alodinia induzida por CINC-1 e DA em modelos experimentais em camundongos.

As cascas do tronco de *M. ovata* são usadas na medicina popular como antipirético enquanto que as folhas são consideradas úteis contra diabetes (Mors et al., 2000). O uso popular como antidiabético não foi comprovado a partir do extrato bruto de folhas da *M. ovata*. Nenhum efeito hipoglicemiante, normoglicemiante ou hiperglicemiante foi observado em ratos diabéticos (Morato et al., 1989). Em contrapartida, o óleo essencial extraído de folhas mostraram atividade antibacteriana (Apel et al., 2006). O extrato de cascas dos troncos mostrou atividade inseticida (Coelho et al., 2006). Recentemente nosso grupo de pesquisas mostrou que o extrato etanólico de *M. ovata* (EEMO) possui atividade antiinflamatória e antipirética. Este efeito, em parte, se deve a presença de costunolídio no extrato, confirmando assim o uso na medicina popular como antipirética (Kassuya et al., 2009).

Pelo fato de várias substâncias que possuem atividade antipirética compartilharem o efeito analgésico, como é o caso dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), nós propusemos estudar se a *M. ovata* (EEMO) possui atividade analgésica, além da atividade antipirética e antiinflamatória já descrita por Kassuya et al. em 2009.

Para tanto, foram utilizados alguns modelos experimentais de nocicepção. Existem vários modelos de nocicepção em animais de laboratório que estão disponíveis para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos. Entretanto, esses modelos possuem características específicas que devem ser consideradas, entre elas: simplicidade, sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, validade dos resultados obtidos e a possibilidade da correlação com estudos clínicos (Dickenson e Besson, 1997).

Para iniciar o estudo da atividade antinociceptiva, optamos pelo modelo das contorções abdominais induzidas pela injeção i.pl. de ácido acético. Este modelo é relativamente simples, mas possui pouca especificidade, ou seja, apresenta falsos positivos com frequência. É um experimento rápido, de fácil observação e com boa sensibilidade para várias drogas analgésicas e AINEs, bem como para drogas semelhantes à morfina e de ação central. Além disso, os resultados obtidos neste modelo com as diversas classes de analgésicos apresentam boa correlação com a ação analgésica em modelos pré-clínicos e estudos clínicos (Siegmund et al., 1957, Koster et al., 1959, Bentley et al., 1981). O que reforça a confiabilidade dos nossos resultados.

O ácido acético atua indiretamente liberando mediadores endógenos como a bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas, que estão envolvidos na modulação da nocicepção. A nocicepção induzida pelo ácido acético também depende da liberação de citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-8 pelos macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal, que em conjunto com outros mediadores induzem a nocicepção deste modelo (Whittle, 1964, Ribeiro et al., 2000).

EEMO foi potente em inibir as contorções abdominais, quando comparado com a ação de outros extratos de plantas usando metodologia similar. Por exemplo, foram encontrados valores de ID₅₀ variando entre 72 e 700mg/kg v.o. em trabalhos prévios de extratos de plantas como *Polygala cyparissias*, *Rosmarinus officinalis* L., *Drimys winteri*, e *Stachytarpheta cayennensis* (de

Campos et al., 1997, Mendes et al., 1998, Mesia-Vela et al., 2004, Gonzalez-Trujano et al., 2007). Estes valores estão acima dos encontrados para EEMO que foi de 18,7 (7,15-48,85) mg/kg, sugerindo que o potencial efeito analgésico desta planta deve ser considerado e o estudo deveria ser estendido. Xilopina e AXIL estão entre os primeiros compostos que isolamos da *M. ovata*. Entretanto, quando testamos para a atividade antipirética, estes compostos não foram efetivos em bloquear a resposta febril induzida pelo lipopolissacarídeo ou o edema de pata induzido pela carragenina. Por outro lado, encontramos o costunolideo, outro composto isolado, que possui potente atividade antipirética e antiinflamatória (Kassuya et al., 2009).

Testes preliminares com a fração rica em xilopina (F2, descrita nos métodos) mostraram potente atividade analgésica (dados não mostrados). Então, decidimos purificar este alcalóide e produzir uma preparação mais estável, uma vez que a xilopina é muito instável, se oxidando rapidamente no ambiente. Obtivemos, desta forma, a N-acetil xilopina (AXIL). A AXIL também apresentou redução significativa no número de contorções abdominais da nocicepção induzida pelo ácido acético (Fig 7).

Embora o EEMO e AXIL tivessem mostrado efetividade no teste das contorções abdominais, pelo fato deste modelo possuir pouca especificidade, é comum a ocorrência de falsos positivos neste teste. Então, decidimos avaliar o extrato e o composto isolado utilizando outros modelos de nocicepção, como o da formalina e da hiperalgesia mecânica.

O teste de nocicepção pela formalina é um ensaio inflamatório que envolve caracteristicamente respostas comportamentais que envolvem a organização supraespinhal. É um modelo bifásico de resposta nociceptiva, consiste na aplicação i.pl. de solução de formaldeído na pata posterior do animal. Esta injeção desencadeia intensa nocicepção por estímulo direto dos nociceptores (Fase I – dor neurogênica) e posterior sensibilização dos nociceptores (Fase II – dor do tipo inflamatória) (Hunskar et al., 1985, Hunskar e Hole, 1987).

A primeira fase (Fase I) de nocicepção inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, e se estende pelos primeiros 5 minutos, entendida como sendo devido a estimulação química direta dos nociceptores (Dubuisson e Dennis, 1977, Hunskar et al., 1985) e está associada a liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, substância P e outros. Existem estudos mostrando que a formalina

atua diretamente sobre receptores TRPA1 (Receptor de potencial transitório com domínios anquirina 1), membro de uma família de canais catiônicos TRP (receptor de potencial transitório), expresso em um subgrupo de neurônios do gânglio da raiz dorsal, co-localizados com receptores TRPV1 (receptor de potencial transitório vanilóide 1). (McNamara et al., 2007, Mogil, 2009). TRPA1 pode ser ativado com temperatura de 17°C, enquanto TRPV1 é ativado por temperaturas acima de 43°C e também pela capsaicina, um composto das pimentas vermelhas (McKemy et al., 2002, Story et al., 2003).

Já a segunda fase (Fase II), ocorre nos minutos subsequentes (consideramos entre 15 e 30 minutos) após a injeção da formalina e está relacionada à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios entre eles: bradicinina, histamina, substância P, serotonina e prostaglandinas, que interagem com seus respectivos receptores para manifestação do efeito nociceptivo característico (dor inflamatória) (Hunskar et al., 1985, Hunskar e Hole, 1987, Correa e Calixto, 1993, Damas e Liegeois, 1999). A dor inflamatória está associada à sensibilização de nociceptores que compõe esta via nociceptiva, levando a sensação dolorosa em resposta tanto a estímulos nocivos (hiperalgesia) quanto aos não nocivos (alodinia).

Os resultados mostram que o EEMO e AXIL produzem antinocicepção contra a fase inflamatória da formalina (Fase II), mas não contra a fase de dor neurogênica (Fase I). Considerando estes resultados e supondo que EEMO e AXIL estejam atuando na sensibilização de nociceptores, prosseguimos com o estudo da atividade analgésica desta planta testando o modelo da alodinia mecânica induzida pela carragenina.

A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa a partir de algas das famílias *Gigartineae*, *Solieriaceae*, *Hypneaecae* e *Furcellariaceae* da classe Rhodophyceae (algas vermelhas). A administração desta substância em patas dos animais promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores que contribuem também para a intensa migração celular ao sítio inflamatório (Crunkhorn e Meacock, 1971, Henriques et al., 1987). A carragenina induz uma hipernocicepção mecânica em camundongos, que inicia a liberação de uma cascata de citocinas: TNF- α , IL-1 β , PGs, KC e SA, que são responsáveis pela sensibilização do nociceptor (Cunha et al., 2005).

A liberação destes diversos mediadores promovido pela injeção da carragenina sensibiliza os nociceptores levando a sensação dolorosa após o estímulo não nocivo (alodinia) da aplicação dos filamentos de Von Frey na pata inflamada. Isto constitui a base do teste da alodinia mecânica que foi utilizada no presente estudo, modelo descrito por Chaplan et al, 1994 (Dixon, 1991, Chaplan *et al.*, 1994, Sandkuhler, 2009).

Os resultados que mostram que o EEMO e AXIL produzem antinocicepção na fase inflamatória da formalina reforçam o efeito inibitório da alodinia mecânica induzida pela carragenina produzida pelo extrato e pelo composto. Uma vez que a carragenina induz um processo inflamatório local intenso, que é responsável pela sensibilização dos nociceptores.

Levando em consideração os dados descritos acima, estes resultados sugerem que EEMO e principalmente AXIL estejam agindo por alteração no processo de sensibilização de nociceptores (um fenômeno comum durante a resposta inflamatória) por bloqueio da ativação e sensibilização de nociceptores pelo EEMO e da sensibilização pela AXIL. A inibição da segunda fase da formalina (fase inflamatória) e da alodinia induzida pela carragenina pela AXIL, juntamente com resultados prévios de evidências de que a xilopina inibe a agregação plaquetária (Chen et al., 1996a, Chen et al., 1996b) podem também sugerir que esta droga possui um mecanismo de ação similar as drogas AINEs. No entanto, como mencionado anteriormente, resultados preliminares também indicaram que AXIL era ineficiente em produzir a redução do edema causado pela carragenina e também ineficaz em reduzir a febre induzida pelo lipopolissacarídeo, respostas que são bloqueadas por AINEs (Menezes-de-Lima et al., 2006) sugerindo que a inibição da síntese de prostaglandinas não seria o principal mecanismo de ação desta substância.

Pelo fato de AXIL (0,15 mg/kg, v.o.) promover uma completa inibição da alodinia induzida pela carragenina e da nocicepção induzida pela formalina e o fato da análise ¹H-NMR da fração de alcalóides ter mostrado que o componente em maior quantidade em F2 é a xilopina, sugerem que a ação analgésica apresentada por EEMO é, pelo menos em parte, devido a presença deste alcalóide. A comparação da potência da xilopina original com AXIL seria interessante, mas não pôde ser realizada, pois a xilopina pura é instável e se oxida muito rapidamente. Portanto, enfatizamos que o derivado AXIL pode ser a

melhor escolha por ser a forma mais estável. Além disso, mencionamos anteriormente que a fração rica em xilopina recentemente preparada foi imediatamente testada, mostrando efeito similar em doses comparáveis.

Outro ponto interessante a ser considerado é que AXIL pode estar agindo periféricamente na sensibilização de fibras nociceptoras. A primeira evidência deste efeito periférico reside no efeito analgésico da AXIL quando injetada localmente. Mostramos que a injeção local em doses bem baixas (0,3 a 30 ng) na pata também reverte a diminuição do limiar de nocicepção mecânico induzido pela carragenina. O efeito local de AXIL foi confirmado com o tratamento da pata contralateral a aplicação de carragenina e a não observação da redução da nocicepção. Estes resultados, em conjunto, sugerem que AXIL age localmente na redução da sensibilização de fibras nervosas nociceptivas.

Em adição, para avaliar se EEMO e AXIL são eficazes em produzir antinocicepção em modelos de estímulos nocivos térmicos, testamos o modelo da placa quente, inicialmente descrito por Woolfe e Macdonald, 1994 e posteriormente modificado por Eddy e Leimback, 1953. Este modelo é sensível para drogas que atuam centralmente (atuação no SNC – medula espinhal e encéfalo). Utilizando este teste é possível determinar a hiperalgesia térmica. Além disso, este modelo é útil na pesquisa de drogas analgésicas (Woolfe e Macdonald, 1944, Eddy e Leimback, 1953, Carter, 1991).

O modelo da placa quente caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores (fibras C e A δ). As fibras nociceptoras são ativadas após a ativação dos receptores vanilóides, que são responsáveis pela resposta ao aumento da temperatura (Dickenson e Besson, 1997, Julius e Basbaum, 2001).

Nem EEMO, nem AXIL foram capazes de alterar o tempo de latência sobre a placa aquecida nas mesmas doses em que reduziram as contorções, a nocicepção da formalina e a hiperalgesia mecânica, sendo este mais um indício de que o extrato e o composto estejam agindo periféricamente e não no sistema nervoso central.

Um viés nos estudos de substâncias analgésicas que deve ser descartado é a alteração no desempenho motor produzidas por algumas substâncias, que pode ser erroneamente avaliada como ação analgésica, uma vez que a maioria dos modelos experimentais utilizados avalia uma alteração no comportamento motor

(elevação da pata, lambidas nas patas, retirada da pata, contorções) produzindo resultados falso-positivos. Sendo assim, a maior fonte de erros em estudos sobre drogas que interferem na transmissão nociceptiva tanto periféricamente como centralmente é a modificação no desempenho motor do animal (Millan, 1999, Millan, 2002).

Desta forma, para verificar se EEMO e AXIL produzem ou não uma alteração no desempenho motor, testamos essas drogas no modelo do *rota-rod*. Os resultados mostraram que nem o EEMO nem a AXIL alteram o desempenho motor dos animais nas doses em que reduzem a nocicepção, comprovando assim, que a redução do comportamento nociceptivo dos animais nos modelos testados são devidos ao efeito analgésico e não à alteração no desempenho motor.

Para o estudo da determinação do possível mecanismo de ação pelo qual a AXIL age, decidimos analisar como ela estaria alterando a sensibilização dos nociceptores, verificando quais as substâncias da cascata de citocinas mediadoras da hiperalgesia inflamatória mecânica que a AXIL é capaz de bloquear em camundongos.

Cunha et al, 2005 propõe uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios iniciados pela carragenina na hiperalgesia mecânica em camundongos. A carragenina ativa liberação de duas vias de citocinas: TNF- α e KC. Ambos atuam na liberação de IL-1 β e prostanóides por IL-1 β . No entanto, KC atua adicionalmente por meio das aminas simpatomiméticas. Além disso, TNF- α pode atuar diretamente na sensibilização dos nociceptores (Cunha et al., 2005). (Figura 3).

A carragenina induz hiperalgesia em ratos ativando o sistema de cininas plasmáticas com conseqüente produção de bradicinina, que induz TNF- α por meio de ativação de receptores B1 e B2. Em contraste, em camundongos, a hiperalgesia inflamatória mediada pela bradicinina não depende de citocinas. BK ativa diretamente a liberação de PGs e SA (Cunha et al., 2005).

Sendo assim, utilizando o modelo da hiperalgia mecânica com filamentos de von Frey, verificamos o efeito da AXIL frente aos mediadores BK, TNF- α , IL-1 β , PG-E₂, CINC-1 e DA na indução da hiperalgesia.

Como não foi possível a aquisição de KC, que é a quimiocina específica de camundongos (*Mus musculus*), cujo nome completo original é *chemokine* (C-X-C

motif) *ligand 1* e abreviatura Cxcl1, utilizamos CINC-1, que é a quimiocina específica de ratos (*Rattus norvegicus*), cujo nome completo original é *chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)* e o símbolo Cxcl1, sabendo que estas quimiocinas não são muito seletivos ao se ligarem em diferentes receptores de quimiocinas.

Um outro fato importante é que CINC e KC são homólogos da IL-8 (CXCL8) humana, uma citocina pró inflamatória.

As quimiocinas são classificadas em subfamílias: CXC (maioria pró-inflamatórias, e induzem quimiotaxia dependente de receptores a que se ligam), CC (maioria pró-inflamatória, importantes na inflamação crônica e alérgica), CX3C (representada pela fractalina quimiotática para mononucleares) e XC (representada pela linfotactina, quimiotática para linfócitos T e células dendríticas). Existem 4 famílias de receptores de quimiocinas. CXCR são 5 subtipos, CCR são 9 subtipos, CX3CR e XCR (Penas, 2006, Alessandri, 2007)

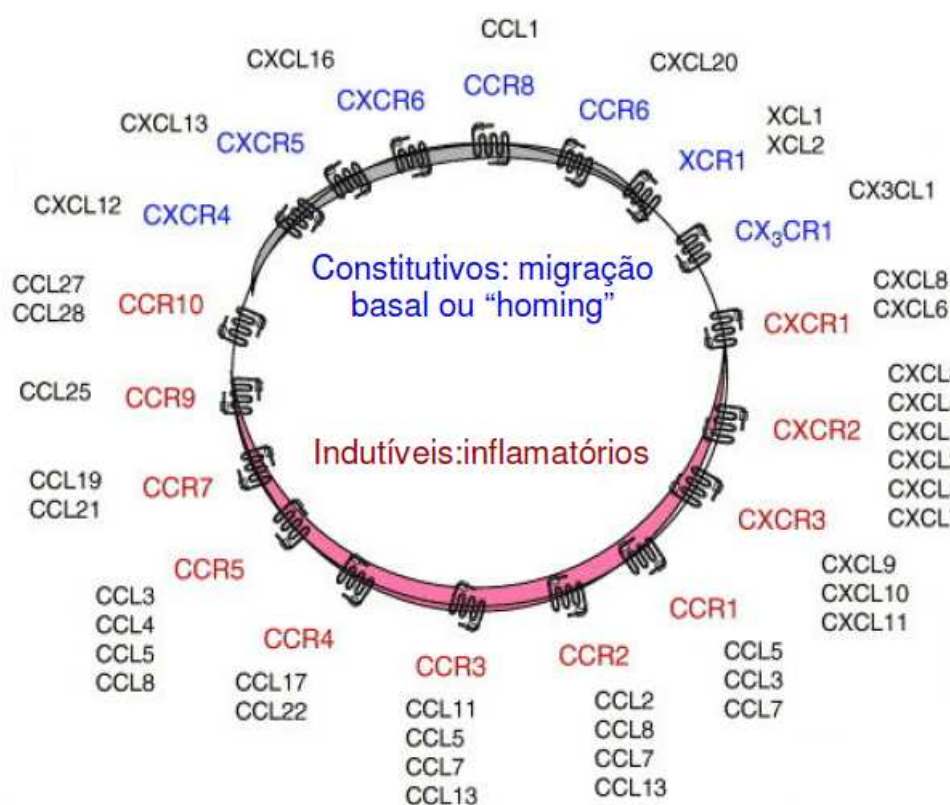


Figura 14. Figura modificada de Johnson *et al.*, 2005, mostrando as quimiocinas, a classificação e seus receptores.

Levando-se em consideração o que foi descrito, e baseando-se no diagrama da sequência de liberação de mediadores inflamatórios por ação da carragenina em modelos de sensibilização mecânica de nociceptores em camundongos, podemos propor um possível mecanismo de ação para AXIL.

O resultado do tratamento local com AXIL inibiu significativamente a hiperalgesia induzidas por BK, TNF- α , IL-1 β e PG-E2, mas não inibiu quando administradas CINC-1 e DA. Estes resultados sugerem que AXIL age periféricamente e preferencialmente no componente de prostaglandinas da sensibilização de nociceptores, mas não no componente simpático. Apesar dos resultados mostrarem que AXIL não foi capaz de inibir a nocicepção induzida nem por CINC-1 nem por DA, a participação do simpático na sensibilização dos nociceptores precisa ser melhor avaliada para confirmar essa ação da AXIL.

Outro dado importante que sugere a ação periférica da AXIL é a incapacidade deste composto em alterar o tempo de latência dos animais sobre a placa aquecida.

7) CONCLUSÃO

Apesar de diferentes espécies de *Magnolia* não serem utilizadas na medicina popular como analgésicos, os resultados deste estudo são relevantes pelo fato desta espécie ser amplamente utilizada na medicina popular no Brasil e no mundo e pela xilopina estar presente em outras plantas do mesmo gênero (Plantinet et al., 1985, Nonato et al., 1990).

Este trabalho evidencia que EEMO e o derivado semi-sintético AXIL exercem uma pronunciada antinocicepção sistêmica contra estímulos nocivos produzidos por ácido acético, formalina e carragenina em camundongos. A atividade antinociceptiva do EEMO é causado, pelo menos em parte, pela presença da xilopina e este alcalóide reduz a sensibilização de nociceptores.

É possível que a AXIL possa estar agindo pela inibição da sensibilização periférica de nociceptores, preferencialmente na inibição do componente de prostaglandinas dessa sensibilização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alessandri, A. L. O. F. *Avaliação da atividade farmacológica de uma família de proteínas ligantes de quimiocinas deriva da saliva de carrapato*. Doutor, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

Almeida, T. F., Roizenblatt, S. & Tufik, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res*, **1000**, 40-56,2004.

Andreeva, L. & Rang, H. P. Effect of bradykinin and prostaglandins on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity from the rat spinal cord in vitro. *Br J Pharmacol*, **108**, 185-90,1993.

Apel, M. C., Lima, M. E. L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M. C. M., Sobral, M. E. G., Suffredini, I. B. & Moreno, P. R. H. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest. *Pharmacologyonline*, **3**, 376-383,2006.

Austin, C. E., Faussner, A., Robinson, H. E., Chakravarty, S., Kyle, D. J., Bathon, J. M. & Proud, D. Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem*, **272**, 11420-5,1997.

Barnes, P. J. & Adcock, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 436-41,1993.

Battaglia, G. & Rustioni, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J Comp Neurol*, **277**, 302-12,1988.

Bentley, G. A., Newton, S. H. & Starr, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *Br J Pharmacol*, **73**, 325-32,1981.

Birrell, G. J., McQueen, D. S., Iggo, A., Coleman, R. A. & Grubb, B. D. PGI₂-induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. *Neurosci Lett*, **124**, 5-8,1991.

Botting, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res*, **110**, 269-72,2003.

Bucay, J. W. Uso Tradicional e Investigación Científica de Talauma mexicana (D.C.) Don, o Flor del Corazón. *Rev Mex Cardiología*, **13**, 31-38,2002.

Calixto, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, **33**, 179-89,2000.

Calixto, J. B., Santos, A. R., Cechinel Filho, V. & Yunes, R. A. A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: their chemistry, pharmacology, and therapeutic potential. *Med Res Rev*, **18**, 225-58,1998.

- Callaway, D. J. *The World of Magnolias* Timber Press, Portland, Oregon, 1994.
- Carlton, S. M., Zhou, S. & Coggeshall, R. E. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res*, **790**, 160-9, 1998.
- Carter, R. B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*, **47**, 211-20, 1991.
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S. & Simmons, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13926-31, 2002.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. & Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, **53**, 55-63, 1994.
- Chen, K. S., Ko, F. N., Teng, C. M. & Wu, Y. C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med*, **62**, 133-6, 1996a.
- Chen, K. S., Ko, F. N., Teng, C. M. & Wu, Y. C. Antiplatelet of vasorelaxing actions of some benzylisoquinoline and phenanthrene alkaloids. *J Nat Prod*, **59**, 531-4, 1996b.
- Chestnut, D. H., Abrão, S. E. & Black, S. *Year Book of Anesthesiology and Pain Management*. Elsevier, 2008.
- Coelho, A. A., de Paula, J. E. & Espindola, L. S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvao & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotrop Entomol*, **35**, 133-8, 2006.
- Correa, C. R. & Calixto, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br J Pharmacol*, **110**, 193-8, 1993.
- Costigan, M. & Woolf, C. J. Pain: molecular mechanisms. *J Pain*, **1**, 35-44, 2000.
- Coutaux, A., Adam, F., Willer, J. C. & Le Bars, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine*, **72**, 359-71, 2005.
- Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia Univ Press, New York, 1981.
- Crunkhorn, P. & Meacock, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. *Br J Pharmacol*, **42**, 392-402, 1971.
- Cunha, F. Q., Lorenzetti, B. B., Poole, S. & Ferreira, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol*, **104**, 765-7, 1991.

Cunha, F. Q., Poole, S., Lorenzetti, B. B. & Ferreira, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **107**, 660-4,1992.

Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Schivo, I. R., Napimoga, M. H., Parada, C. A., Poole, S., Teixeira, M. M., Ferreira, S. H. & Cunha, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol*, **83**, 824-32,2008.

Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Silva, J. S., Poole, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1755-60,2005.

Damas, J. & Liegeois, J. F. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **359**, 220-7,1999.

Dannhardt, G. & Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors--current status and future prospects. *Eur J Med Chem*, **36**, 109-26,2001.

de Campos, R. O., Santos, A. R., Vaz, Z. R., Pinheiro, T. R., Pizzolatti, M. G., Cechinel Filho, V., Delle Monache, F., Yunes, R. A. & Calixto, J. B. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci*, **61**, 1619-30,1997.

Dickenson, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. *The pharmacology of pain*. (ed M. J. D. Besson, A.), pp. 21-41. Springer-Verlag, Berlin, 1997.

Dickenson, A. & Besson, J. M. *The Pharmacology of Pain Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-verlang, Berlin,1997.

Dixon, W. J. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **20**, 441-62,1980.

Dixon, W. J. Staircase bioassay: the up-and-down method. *Neurosci Biobehav Rev*, **15**, 47-50,1991.

Doursout, M. F., Liang, Y. & Chelly, J. E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. *Can J Anaesth*, **50**, 909-16,2003.

Dray, A. Inflammatory mediators of pain. *Br J Anaesth*, **75**, 125-31,1995.

Dray, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol*, **75**, 704-12,1997.

Dray, A. & Bevan, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 287-90,1993.

Dubuisson, D. & Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, **4**, 161-74,1977.

Dunham, N. W. & Miya, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)*, **46**, 208-9,1957.

Eddy, N. B. & Leimbach, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther*, **107**, 385-93,1953.

Falkenberg, M. B. P., P. A. Epibatidina: uma breve revisão. *Lat am j Pharm*, **26**, 614-618,2007.

Ferreira, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. *Drugs*, **46 Suppl 1**, 1-9,1993.

Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B. & Poole, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **110**, 1227-31,1993.

Fukuoka, H., Kawatani, M., Hisamitsu, T. & Takeshige, C. Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat. *Brain Res*, **657**, 133-40,1994.

Furst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res Bull*, **48**, 129-41,1999.

George, A., Buehl, A. & Sommer, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol*, **192**, 163-6,2005.

Gonzalez-Trujano, M. E., Pena, E. I., Martinez, A. L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M. & Lopez-Munoz, F. J. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol*, **111**, 476-82,2007.

Guyton, A. C. & Hall, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,2002.

Haber, W. A., Agius, B. R., Stokes, S. L. & Setzer, W. N. Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oil of *Talauma gloriensis* Pittier (Magnoliaceae) from Monteverde, Costa Rica. *Rec. Nat. Prod*, **2**, 1-5,2008.

Hay, C. H., Trevethick, M. A., Wheeldon, A., Bowers, J. S. & de Belleruche, J. S. The potential role of spinal cord cyclooxygenase-2 in the development of Freund's complete adjuvant-induced changes in hyperalgesia and allodynia. *Neuroscience*, **78**, 843-50,1997.

Henriques, M. G., Silva, P. M., Martins, M. A., Flores, C. A., Cunha, F. Q., Assreuy-Filho, J. & Cordeiro, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res*, **20**, 243-9,1987.

Hoffmann, J. J., Torrance, S. J., Widehopf, R. M. & Cole, J. R. Cytotoxic agents from *Michelia champaca* and *Talauma ovata*: parthenolide and costunolide. *J Pharm Sci*, **66**, 883-4,1977.

Hunskar, S., Fasmer, O. B. & Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, **14**, 69-76,1985.

Hunskar, S. & Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, **30**, 103-14,1987.

Hunt, D. Magnolias and Their Allies. *International Dendrology Society & Magnolia Society*,1998.

Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-10,2001.

Kassuya, C. A., Cremoneze, A., Barros, L. F., Simas, A. S., Lapa Fda, R., Mello-Silva, R., Stefanello, M. E. & Zamprônio, A. R. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J Ethnopharmacol*, **124**, 369-76,2009.

Koster, R., Anderson, M. & De Beer, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc*, **18**, 412,1959.

Law, Y. W. & Liu, Y. H. *Magnolias of China*. Beijing Science & Technology Press, Hong-Kong,2004.

Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, **53**, 597-652,2001.

Le Ray, A. M., Lavault, M., Bruneton, J., Chan, K. C., David, B. & Sevenet, T. Lignans and isoquinoline alkaloids from *Talauma betongensis*, a Malaysian Magnoliaceae. *Fitoterapia*, **60**, 464-466,1989.

Lent, R. *Cem Bilhões de Neurônios: Conceitos Fundamentais de Neurociência*. Atheneu, São Paulo,2004.

Levine, J. D., Taiwo, Y. O., Collins, S. D. & Tam, J. K. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. *Nature*, **323**, 158-60,1986.

Loeser, J. D. & Melzack, R. Pain: an overview. *Lancet*, **353**, 1607-9,1999.

Loeser, J. D. & Treede, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, **137**, 473-7,2008.

Lofgren, O., Qi, Y. & Lundeberg, T. Inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on thermally induced inflammatory reactions in a rat model. *Burns*, **25**, 125-9,1999.

Lopes, P., Kar, S., Chretien, L., Regoli, D., Quirion, R. & Couture, R. Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience*, **68**, 867-81,1995.

Lopes, P., Kar, S., Tousignant, C., Regoli, D., Quirion, R. & Couture, R. Autoradiographic localization of [125I-Tyr8]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse*, **15**, 48-57,1993.

Lorenzetti, B. B., Veiga, F. H., Canetti, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw*, **13**, 456-61,2002.

Lorenzi, H. *Árvores Brasileiras . Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil* Instituto Plantarum, Nova Odessa,2000.

Lozano-Contreras, G. Magnoliaceae nativas del Brasil. *Rev Acad Colomb Cienc*, **17**, 569-583,1990.

Malmberg, A. B. & Yaksh, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci*, **15**, 2768-76,1995.

Mao, J. & Chen, L. L. Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. *Pain*, **87**, 7-17,2000.

Marceau, F., Hess, J. F. & Bachvarov, D. R. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*, **50**, 357-86,1998.

Marchand, F., Perretti, M. & McMahon, S. B. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, **6**, 521-32,2005.

Markenson, J. A. Mechanisms of chronic pain. *Am J Med*, **101**, 6S-18S,1996.

Mathis, S. A., Criscimagna, N. L. & Leeb-Lundberg, L. M. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, **50**, 128-39,1996.

McKemy, D. D., Neuhausser, W. M. & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, **416**, 52-8,2002.

McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M. & Fanger, C. M.

TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13525-30,2007.

Mendes, G. L., Santos, A. R., Campos, M. M., Tratsk, K. S., Yunes, R. A., Cechinel Filho, V. & Calixto, J. B. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci*, **63**, 369-81,1998.

Menezes-de-Lima, O., Jr., Kassuya, C. A., Nascimento, A. F., Henriques, M. G. & Calixto, J. B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **80**, 123-35,2006.

Mesia-Vela, S., Souccar, C., Lima-Landman, M. T. & Lapa, A. J. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. *Phytomedicine*, **11**, 616-24,2004.

Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, **57**, 1-164,1999.

Millan, M. J. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, **66**, 355-474,2002.

Mogil, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 283-94,2009.

Morato, G. S., Calixto, J. B., Cordeiro, L., de Lima, T. C., Morato, E. F., Nicolau, M., Rae, G. A., Takahashi, R. N., Valle, R. M. & Yunes, R. A. Chemical and pharmacological studies on *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae). *J Ethnopharmacol*, **26**, 277-86,1989.

Morita, K., Morioka, N., Abdin, J., Kitayama, S., Nakata, Y. & Dohi, T. Development of tactile allodynia and thermal hyperalgesia by intrathecally administered platelet-activating factor in mice. *Pain*, **111**, 351-9,2004.

Mors, W. B., Rizzini, C. T. & Pereira, N. A. (2000) Medicinal Plants of Brazil. pp. 216. Reference Publications Inc, Michigan.

Murphy, P. G., Ramer, M. S., Borthwick, L., Gauldie, J., Richardson, P. M. & Bisby, M. A. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *Eur J Neurosci*, **11**, 2243-53,1999.

Ni, A., Chao, L. & Chao, J. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem*, **273**, 2784-91,1998.

Nonato, M. G., Garson, M. J., Truscott, R. J. W. & Carver, J. A. H-NMR assignments of anonaine and xylopine derivatives from *Talauma gitingensis*. *Journal of Natural Products*, **33**, 1623-1627,1990.

Okuda, K., Sakurada, C., Takahashi, M., Yamada, T. & Sakurada, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. *Pain*, **92**, 107-15,2001.

Pairet, M. & Engelhardt, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol*, **10**, 1-17,1996.

Penas, A. I. (2006) Regulação e Amplificação da reacção imunológica: Citocinas e Quimioquinas. *Imunologia*, pp. 8. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto.

Pereira, E. M. *Avaliação do papel de receptores NMDA para glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos*. Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

Plantinet, C., Sevenet, T., Chan, K. C. & Bruneton, J. (1985) Alcaloides de Talauma cf T. obovata Korthals. Considérations chimiotaxonomiques. *Considérations chimiotaxonomiques*, pp. 89-191. Annales Pharmaceutiques, France.

Poole, S., Cunha, F. Q. & Ferreira, S. H. Cytokines and Pain. (eds L. R. Watkins & S. F. Maier), pp. 59-87. Springer, Berlin, 1999.

Puertas, M. A., Mesa, M. A. M. & Sáez, J. A. In vitro radical scavenging activity of two columbian Magnoliaceae. *Naturwissenschaften*, **92**, 381-384,2005.

Ren, K. & Dubner, R. Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, **100**, 1-6,2002.

Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Thomazzi, S. M., Paschoalato, A. B., Poole, S., Ferreira, S. H. & Cunha, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol*, **387**, 111-8,2000.

Roblot, F., Hocquemiller, R. & Cave, A. Alcaloides des annonacees, XLIV. Alcaloides de Duguetia obovata. *Journal of Natural Products*, **46**, 862-873,1983.

Rocha e Silva, M. O. Brief history of inflammation. *Handbook of Experimental Pharmacology* (eds J. R. Vane & S. H. Ferreira), pp. 6-25. Springer-Verlag, New York, 1978.

Sandkuhler, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*, **89**, 707-58,2009.

Schafers, M., Brinkhoff, J., Neukirchen, S., Marziniak, M. & Sommer, C. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett*, **310**, 113-6,2001.

Schaible, H. G. & Schmidt, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. *J Physiol*, **403**, 91-104,1988.

Sherwood, E. R. & Toliver-Kinsky, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, **18**, 385-405,2004.

Siegmund, E. A., Cadmus, R. A. & Lu, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **119**, 184-193,1957.

Simões, C. M. O. S., E. P. A Pesquisa e a Produção Brasileira de Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais: a Necessária Interação da Indústria com a Academia. *Rev Bras Farmacognosia*, **12**, 35-40,2002.

Simões, C. M. O. S., E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Editora da UFSC e UFRGR Editora,2007.

Sousa, A. M. & Prado, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res*, **897**, 9-19,2001.

Stefanello, M. E., Alvarenga, M. A. & Toma, I. N. New neolignans from *Talauma ovata*. *Fitoterapia*, **73**, 135-9,2002.

Stefanello, M. E. A. & Alvarenga, M. A. Constituents of *Talauma ovata* bark. *Fitoterapia*, **68**, 475-476,1997.

Stefanello, M. E. A., Alvarenga, M. A., Toma, I. N. & Mello-Silva, R. Ocorrência de qimiotipos em *Talauma ovata*, uma planta medicinal brasileira. *Rev. Bras. Pl. Med.*, **8**, 1-3,2005.

Stefanello, M. E. A. M.-S., R. Stefanello MEA, Mello-Silva R (2005a). Volatile constituents of *Talauma ovata* A. St. Hil. *J. Essent. Oil Res.*, **17**, 455-456. Volatile constituents of *Talauma ovata* A. St. Hil. *J.Essent. Oil Res*, **17**, 455-456,2005.

Stein, C., Millan, M. J. & Herz, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*, **31**, 455-51,1988.

Steranka, L. R., Manning, D. C., DeHaas, C. J., Ferkany, J. W., Borosky, S. A., Connor, J. R., Vavrek, R. J., Stewart, J. M. & Snyder, S. H. Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3245-9,1988.

Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, **112**, 819-29,2003.

Syriatowicz, J. P., Hu, D., Walker, J. S. & Tracey, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience*, **94**, 587-94,1999.

Talapatra, S. K., Mukhopadhyay, S. K. & Talapatra, B. Lignans and alkaloids of *Talauma hodgsonii*. *J. Indian Chem. Soc.*, **54**, 790-791,1977.

Teoh, H., Malcangio, M., Fowler, L. J. & Bowery, N. G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not gamma-aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. *Eur J Pharmacol*, **302**, 27-36,1996.

Tonai, T., Taketani, Y., Ueda, N., Nishisho, T., Ohmoto, Y., Sakata, Y., Muraguchi, M., Wada, K. & Yamamoto, S. Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*, **72**, 302-9,1999.

Treseder, N. G. *Magnolias*. Faber & Faber, London/Boston,1978.

Trinta, E. F. & Santos, E. *Magnoliáceas*. In *Flora Ilustrada Catarinense* Ed A. Reis, Itajai,1996.

Turnbach, M. E. & Randich, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E(2) or zymosan in the rat. *Pain*, **97**, 127-37,2002.

Turolla, M. S. R. N., E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados na Brasil. *Rev Bras Cienc Farm*, **42**, 289-306,2006.

Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, **231**, 232-5,1971.

Vane, J. R. & Botting, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, **44**, 1-10,1995.

Vane, J. R. & Botting, R. M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand J Rheumatol Suppl*, **102**, 9-21,1996.

Vieira, L. M., Kijjoa, A., Silva, M. A. S., Mondranondra, I. O. & Herz, W. 2,3-diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran lignans from *Talauma hodgsonii*. *Phytochem.*, **48**,1998.

Whittle, B. A. Release of a Kinin by Intraperitoneal Injection of Chemical Agents in Mice. *Int J Neuropharmacol*, **3**, 369-78,1964.

Winkelstein, B. A. Mechanisms of central sensitization, neuroimmunology & injury biomechanics in persistent pain: implications for musculoskeletal disorders. *J Electromyogr Kinesiol*, **14**, 87-93,2004.

Woolf, C. J. Pain. *Neurobiol Dis*, **7**, 504-10,2000.

Woolf, C. J. & Salter, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**, 1765-9,2000.


Woolfe, G. & Macdonald, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **80**, 300-307,1944.

Yang, L. C., Marsala, M. & Yaksh, T. L. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE₂ release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. *Pain*, **67**, 345-54,1996.

Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, **16**, 109-10,1983.

ANEXO 1 – “ARTICLE IN PRESS” – PHYTOMEDICINE

AUTHOR QUERY FORM

 ELSEVIER	Journal: PHYMED Article Number: 50888	Please e-mail or fax your responses and any corrections to: E-mail: corrections.esil@elsevier.thomsondigital.com Fax: +353 6170 9272
--	--	---

Dear Author,

Any queries or remarks that have arisen during the processing of your manuscript are listed below and highlighted by flags in the proof. Please check your proof carefully and mark all corrections at the appropriate place in the proof (e.g., by using on-screen annotation in the PDF file) or compile them in a separate list.

For correction or revision of any artwork, please consult <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Articles in Special Issues: Please ensure that the words ‘this issue’ are added (in the list and text) to any references to other articles in this Special Issue.

Uncited references: References that occur in the reference list but not in the text – please position each reference in the text or delete it from the list.	
Missing references: References listed below were noted in the text but are missing from the reference list – please make the list complete or remove the references from the text.	
Location in article	Query / remark Please insert your reply or correction at the corresponding line in the proof
Q1	Ref. Hunskaar et al. (1985) is cited in the text but not provided in the reference list. Please provide it/them in the reference list or delete this citation from the text.

Electronic file usage

Sometimes we are unable to process the electronic file of your article and/or artwork. If this is the case, we have proceeded by:

☐

Scanning (parts of) your article

☐

Rekeying (parts of) your article

☐

Scanning the artwork

Thank you for your assistance.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.de/phyomed



Short communication

Analgesic effects of the ethanolic extract from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) trunk bark and of N-acetylxylopine, a semi-synthetic analogue of xylopine

Lídia Sayuri Mori^a, Shirley Boller^a, Cândida Aparecida Leite Kassuya^{a,b},
Maria Élide Alves Stefanello^c, Aleksander Roberto Zampronio^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Faculty of Health Sciences, Universidade Federal da Grande Dourados, MS, Brazil

^c Department of Chemistry, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Magnolia ovata

Magnoliaceae

Nociception

Mice

N-acetylxylopine

ABSTRACT

This study investigated the antinociceptive effects of the ethanolic extract (EEMO) obtained from *Magnolia ovata* (A.St.-Hil.) Spreng and N-acetylxylopine (AXyl), a stable derivative of xylopine in different models nociception. The EEMO and AXyl inhibited the nociception induced by acetic acid in mice, in a dose-dependent manner with a maximal inhibition of $91 \pm 9\%$ and $50 \pm 11\%$, respectively. Oral administration of EEMO or AXyl also significantly inhibited the inflammatory phase of formalin-induced nociception with maximal reduction of $87 \pm 3.9\%$ and $71 \pm 10\%$, respectively. Confirming the effectiveness of the extract and the isolated compound in inflammatory responses, EEMO or AXyl inhibited carrageenan-induced mechanical allodynia with percentage of inhibition of $40 \pm 6\%$ for EEMO and $82 \pm 8\%$ for AXyl. Intraplantar injection of AXyl in the ipsilateral paw, but not in the contralateral paw, also reduced carrageenan-induced mechanical allodynia in mice. The response of the animals for maximal doses tested of EEMO and AXyl in the hot-plate or rota-rod models were not altered. These results show that the extract from *M. ovata* and the stable derivative AXyl possess analgesic properties towards inflammatory pain acting on peripheral sites.

© 2010 Published by Elsevier GmbH.

Introduction

Symptomatically, pain may be manifested spontaneously or following a challenge with noxious or innocuous stimulation or after damage to, or alterations in, sensory neurons (Woolf and Mannion 1999). During an inflammatory event, pain generation is a consequence of interactions between mediators such as prostaglandins (Samad et al. 2002) and other nociceptive agents (Julius and Basbaum 2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the class of analgesic compounds most widely used to treat mild to moderate pain following injury, disease or minor surgery [see Svensson and Yaksh (2002) for review]. For more severe painful conditions, opioid agonists, carbamazepine, gabapentine, and serotonin re-uptake inhibitors may be useful (Campbell and Meyer 2006). However, the important side effects as well as the ineffectiveness of some drugs in some conditions require the continuous search for new analgesic drugs.

Magnolia ovata (A. St. Hil.) Spreng (old name *Talauma ovata* A. St. Hil) is a Brazilian medicinal plant, that has been used for the treat-

ment of fever (trunk bark) and diabetes (leaves) (Mors et al. 2000). Recently it has been showed that the ethanolic extract from trunk bark of *M. ovata* possess anti-inflammatory and antipyretic effects and, at least in part, those effects were related to the presence of the sesquiterpene lactone costunolide in the extract, supporting its popular medicinal use (Kassuya et al. 2009). Besides costunolide, neolignans, sesquiterpenes and alkaloids were previously reported from the trunk bark and leaves of this plant (Stefanello and Alvarenga 1997; Stefanello et al. 2002, 2009; Barros et al. 2009).

Because *M. ovata* is popularly described as an antipyretic and we could confirm this action (Kassuya et al. 2009), an activity shared by analgesic drugs such as the nonsteroidal anti-inflammatory drugs, the investigation about a potential analgesic activity of whole extract from *M. ovata* (EEMO) was soon initiated. Subsequently, some of the isolated compounds, especially N-acetylxylopine (AXyl), were also tested in currently known models for nociception in mice and the results are described here.

Materials and methods

Animals

The experiments were conducted using male Swiss mice (25–35 g), housed under 12 h light-dark cycle, controlled humidity

* Corresponding author at: Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, CEP 81540-970, Curitiba, Paraná, Brazil, Tel.: +55 41 3361 1540; fax: +55 41 3266 2042.

E-mail address: aleksander@ufpr.br (A.R. Zampronio).

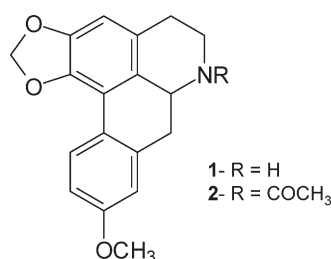


Fig. 1. Chemical structures of xylopinine (1) isolated from *M. ovata* and N-acetylxylopinine (AXyl) (2).

(60–80%), and temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) conditions with free access to food and water. The experiments were carried out in accordance with the guidelines for the care of laboratory animals and ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals, according to (Zimmermann 1983), and were approved by the ethics committee for research on laboratory-animal use of the institution (Nbr. 271). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to show consistent results.

Plant material and isolation of the N-acetylxylopinine

Trunk bark of *M. ovata* A. St. Hil. (Magnoliaceae) were collected in October 2003 in Santos Dumont, Minas Gerais State, Brazil. A voucher specimen (R. Mello-Silva, 2168) was deposited at the Herbarium of Universidade de São Paulo.

Dried and powdered trunk bark was extracted at room temperature with hexane and ethanol, successively. The ethanol extract (EEMO, 10.0 g) was extracted with dichloromethane yielding the respective fraction (F1, 15.4%). This fraction was submitted to acid extraction to give a mixture of alkaloids (F2, 6.7%), mainly xylopinine (1) (Fig. 1). This mixture was acetylated with acetic anhydride and purified by silica gel chromatography to give N-acetylxylopinine (2, AXyl, 14.4%) (Fig. 1), which was identified by analysis of its ¹H NMR and comparison with data previously reported (Stefanello and Alvarenga 1997). The detailed procedure was previously described (Stefanello et al. 2009). The yielding described above was used to calculate the range of doses of AXyl to be used in *in vivo* experiments. NMR spectra were recorded in a Bruker spectrometer (AC-200), using CDCl₃ as solvent and tetramethylsilane as internal reference.

Materials and reagents

Carrageenan, Indomethacin, Fentanyl and Diazepam were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Other drugs and reagents used were of analytical grade.

Abdominal constriction induced by acetic acid

Abdominal constrictions were induced according to previously described procedures (de Campos et al. 1997). Briefly, mice were pretreated with the EEMO (10–100 mg/kg), AXyl (0.015–0.15 mg/kg) or indomethacin (INDO, 5 mg/kg) or vehicle (Tween 80 0.1% for EEMO and Axyl and Tris-buffer pH 8.2 for INDO) by oral route and after 1 h received the i.p. injection of acetic acid (0.8%, 0.45 ml/mouse). Abdominal constrictions were counted cumulatively over a period of 20 min.

Formalin-induced licking

The procedure used was similar to that described previously (Hunskar et al., 1985; Hunskar and Hole 1987). Mice were pre-

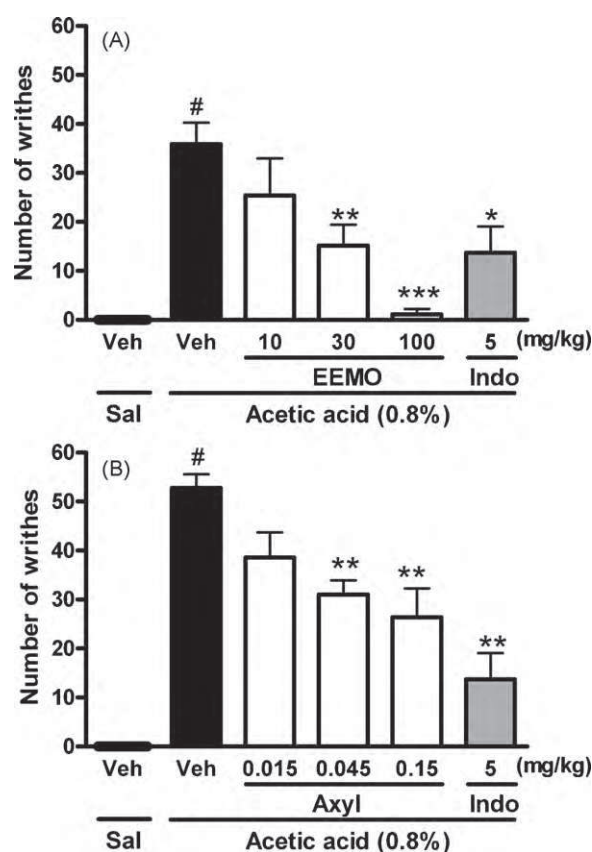


Fig. 2. Effect of the ethanolic extract from *M. ovata* (EEMO, panel A) and N-acetylxylopinine (AXyl, panel B) on acetic acid-induced abdominal constriction in mice. Animals received EEMO (10–100 mg/kg), AXyl (0.015–0.15 mg/kg), indomethacin (Indo, 5 mg/kg) or vehicle (Veh) by the oral route 1 h before receiving the intraperitoneal solution of acetic acid (0.8%) or saline (Sal), and the number of writhes was counted for 20 min. Each bar represents the mean \pm SEM of 6–8 animals. Symbols above the bars denote statistic difference in comparison with the Veh/Sal group ([#] $p < 0.001$) or with Veh/acetic acid group (^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, and ^{***} $p < 0.001$).

treated with the EEMO (10–100 mg/kg), AXyl (0.015–0.15 mg/kg) or vehicle (Tween 80 0.1%) by oral route, 1 h before injection of the 20 μ l of 2.5% formalin (0.92% formaldehyde), in the right hind paw. The animals were then placed in glass cylinders and the time that the animal spent licking and/or elevating of the injected paw was recorded in blocks of 5 min up to 30 min. The first 5 min were considered phase I (neurogenic) while the phase II (inflammatory) was set between 15 and 30 min.

Carrageenan-induced allodynia response in the mouse paw

The mechanical threshold with von Frey hairs was measured using the up-down paradigm as previously described (Chaplan et al. 1994). Mice were pretreated (60 min before, oral route) with the EEMO (100 mg/kg) and AXyl (0.15 mg/kg) or locally (into right or into left paw, 15 min before) with AXyl (0.03–30 ng/paw) and received a 20 μ l s.c. injection into the right hind paw of carrageenan (300 μ g/paw) suspended in sterile 0.9% saline. Control animals received a similar volume of vehicle. The mechanical threshold (in mg) was registered before (basal) and 3–4 h after injection of carrageenan.

Hot-plate test and locomotor performance

The procedure used for both tests was similar to that described previously (Santos et al. 1999). For the hot-plate test, animals were

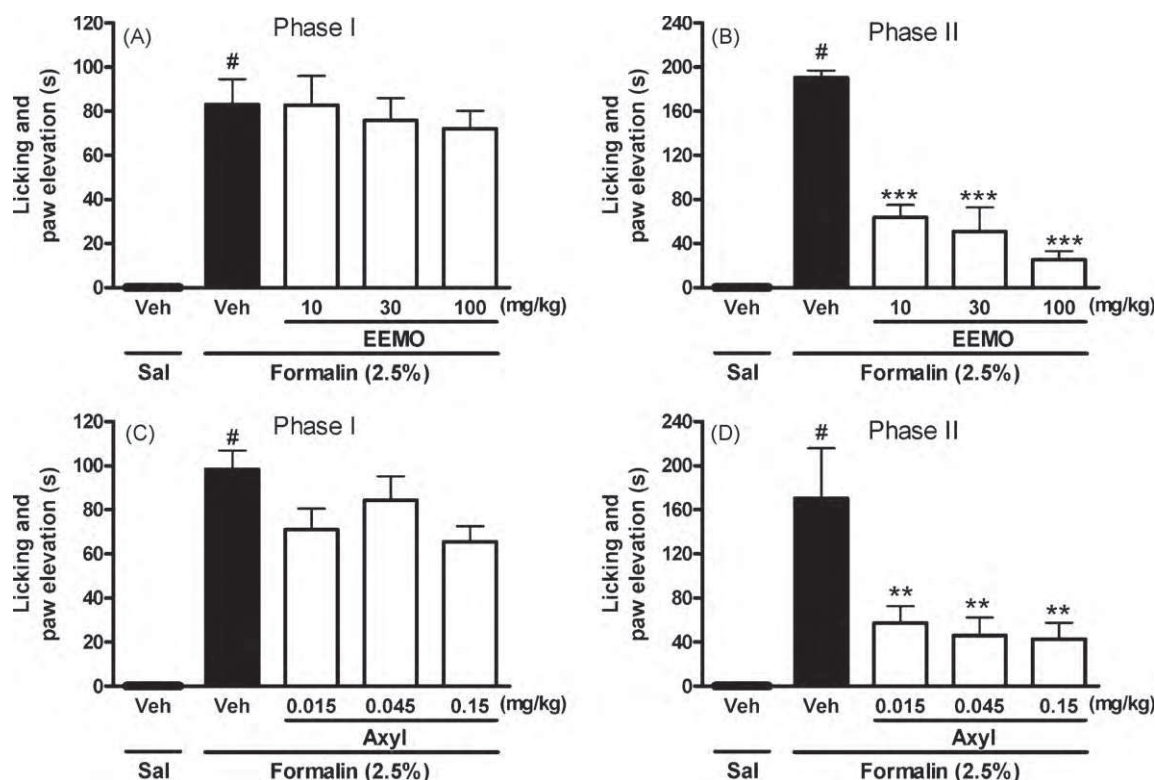


Fig. 3. Effect of oral treatment with EEMO and AXyl on phase I (A and C) and phase II (B and D) of the nociceptive behavior induced by intraplantar injection of formalin. Mice were treated with EEMO (10–100 mg/kg), AXyl (0.015–0.15 mg/kg), or vehicle (Veh, Tween 80 0.1%) and received an intraplantar injection of a 2.5% formalin solution or saline (Sal) after 1 h. Bars show the mean \pm SEM of 6–12 animals. Symbols above the bars denote statistically different in comparison with the Veh/Sal group (# $p < 0.001$) or with Veh/Formalin group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$).

placed on the heated surface ($55 \pm 1^\circ\text{C}$), and latency between the placement and responses of shaking, licking of the paws, or jumping was recorded. A 30-s cutoff was used to prevent tissue damage. Mice were then orally pretreated with EEMO (100 mg/kg), AXyl (0.15 mg/kg), fentanyl (100 $\mu\text{g/kg}$, s.c. – used as a positive control), or with the vehicle (Tween 80 0.1%) and after 1 h (EEMO and AXyl) or 15 min (fentanyl) postdrug latency was evaluated as described before. The percentage of maximal possible effect (%MPE) was calculated as follows: $\%MPE = (\text{postdrug latency} - \text{basal latency}) / (\text{cutoff time} - \text{basal latency}) \times 100\%$. For the evaluation of locomotor performance animals were treated with the same doses of EEMO and AXyl or diazepam (5 mg/kg, s.c.), or with vehicle and subjected to the rotarod task (Ugo Basile, Model 7600, Italy, 22 rpm). Results are expressed as the duration of time (s) for which the animals remained on the rotarod. Cutoff time was set as 180 s.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm SEM, except for the ID_{50} value of EEMO which is reported as the geometric mean accompanied by its respective 95% confidence limit. The statistical significance among the groups was assessed using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman–Keuls' test. p values less than 0.05 were considered an indication of significance.

Results

The results depicted in Fig. 2A show that the EEMO produced a dose-related inhibition of the acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with a mean ID_{50} value (and its respective 95% confidence limits) of 18.7 (7.15–48.85) mg/kg and maximal inhibition of $91 \pm 9\%$. Similarly, the oral treatment of mice with AXyl (0.015–0.15 mg/kg, Fig. 2B) inhibited the abdominal

constrictions with maximal inhibition of $50 \pm 11\%$, an inhibition similar to the reference drug indomethacin ($54 \pm 16\%$). The results depicted in Fig. 3B and D show that EEMO (10–100 mg/kg, p.o.) and N-acetylxypine (AXyl, 0.015–0.15 mg/kg, p.o.) significantly inhibited the inflammatory phase (phase II) of formalin-induced licking with a maximal inhibition of $87 \pm 4\%$ and $71 \pm 10\%$, respectively but did not change the neurogenic phase (phase I, Fig. 3A and C). The intraplantar injection of carrageenan reduced the nociceptive threshold by $98 \pm 1\%$ (Fig. 4A). The oral treatment of the animals with EEMO (100 mg/kg) and AXyl (0.15 mg/kg) significantly inhibited carrageenan-induced mechanical allodynia ($26 \pm 7\%$ and $87 \pm 13\%$, respectively). The local treatment with AXyl (right paw, 0.03–30 ng/paw) also reduced the carrageenan-induced mechanical allodynia (maximal inhibition of $120 \pm 24\%$ at 3 h, Fig. 4B). Additionally, when AXyl was administered into left paw no effect was seen on carrageenan-induced mechanical allodynia observed in the right paw (Fig. 4C). EEMO and AXyl, administered by the p.o. route (at the same doses that inhibited nociception) did not produce any significant increase in latency in the hot-plate test or change in the motor performance on the rotarod task when compared with vehicle-treated animals (data not shown). Fentanyl-treated animals reached 100% of the MPE in the hot plate test while diazepam treated-animals had a significant reduction (28%) on their motor performance.

Discussion

In the present study we showed that the oral treatment of mice with the ethanolic extract from *M. ovata* trunk bark and the semi-synthetic derivative AXyl, produced by acetylation of xylopin isolated from this plant reduced the nociception induced by chemical agents such as acetic acid and formalin and carrageenan-induced hind paw allodynia. AXyl was also effective when given

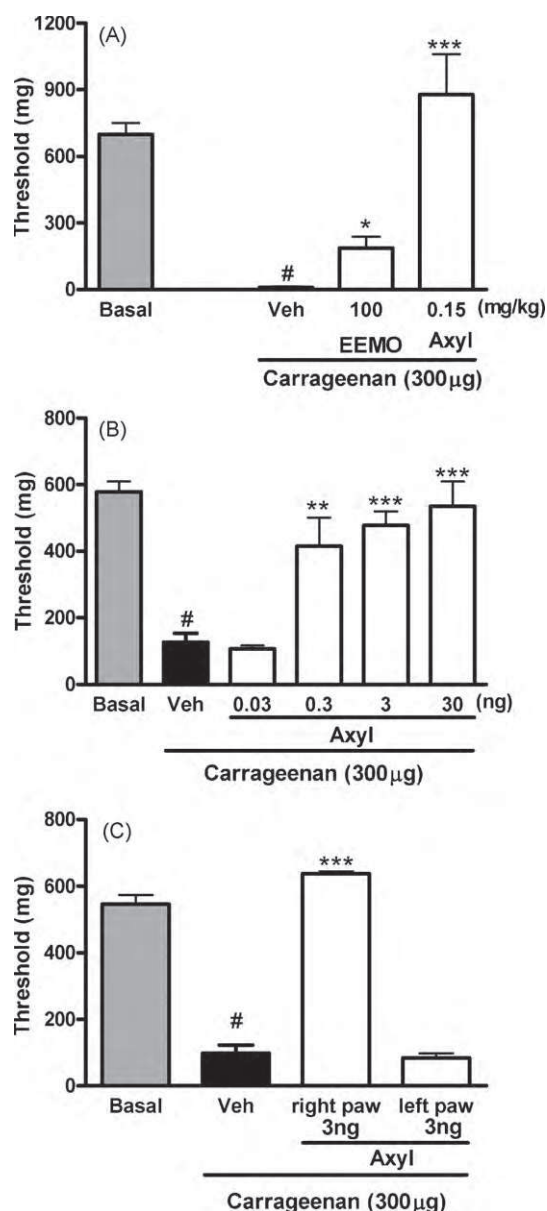


Fig. 4. Effect of systemic administration of EEMO and AXyl (A) or of local administration of AXyl (B and C) on the carrageenan-induced allodynia in mice. The threshold was evaluated for each animal (basal) and then animals received EEMO (100 mg/kg) or AXyl (0.15 mg/kg) or AXyl (0.03–30 ng/paw, into right or into left paw) or the appropriate volume of vehicle (Veh, Tween 80 0.1%) 1 h (for systemic treatment) or 15 min (for local treatment) before the injection of carrageenan (300 μ g/paw). The threshold was evaluated again after 4 h. Each bar represents the mean \pm SEM of 6–12 animals. Symbols above the bars denote statistically different in comparison with the basal group (# p < 0.001) or with Veh/Carrageenan group (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

locally. EEMO and AXyl did not alter the hot-plate latency and motor performance at doses that caused significant antinociception.

Some studies have suggested that the extracts or active substances obtained from other *Magnolia* species have a broad spectrum of biological activities (Villar et al. 1987; Morato et al. 1989; Tsai et al. 1989; Chen et al. 1996a,b; Montenegro et al. 2003; Apel et al. 2006; Coelho et al. 2006). Specifically from the trunk bark of *M. ovata* it was previously reported the isolation of the alkaloids anolobine and xylopinine (as their acetyl derivative), liri-odenine, lanuginosine, O-methylmoschatoline and dicentrinone, the sesquiterpene lactones costunolide and parthenolide, the

sesquiterpene cyclocolorone and the lignans acetyl oleiferin-C, acetyl oleiferin-F, acetyl oleiferin-G, oleiferin-F, dihydrogua-iaetic acid, austrobailignan-5, oleiferin-C, and austrobailignan-6 (Stefanello and Alvarenga 1997; Stefanello et al. 2002, 2009). A screening of the biological activity of the essential oil from *M. ovata* suggested a potential anti-inflammatory activity (Apel et al. 2006). We have recently corroborated the anti-inflammatory activity in the trunk bark extract and also reported that the EEMO has antipyretic activity confirming the popularly known use for this plant (Kassuya et al. 2009). As soon as we identified those actions in EEMO we started to test its analgesic activity since these properties are shared by several aspirin-like analgesics.

EEMO was very effective in inhibiting abdominal constrictions and very potent compared with extracts from other plants evaluated using a similar methodology. For example, an ID₅₀ ranging from 72 to 700 mg/kg, p.o., has been reported in previous works for extracts from plants such as *Polygala cyparissias*, *Rosmarinus officinalis* L., *Drimys winteri*, and *Stachytarpheta cayennensis* (de Campos et al. 1997; Mendes et al. 1998; Mesia-Vela et al. 2004; Gonzalez-Trujano et al. 2007). Those values are above the one we found for EEMO suggesting that the potential analgesic effect in this plant should be further studied. AXyl was among the first compounds isolated from *M. ovata* but it was ineffective in blocking the febrile response induced by lipopolysaccharide or the carrageenan-induced oedema (data not shown). Instead, we found that costunolide was responsible, at least in part, for those activities (Kassuya et al. 2009). However, preliminary tests with the xylopinine-enriched fraction (fraction F2 described in methods) showed a potent analgesic activity. We then decided to purify this alkaloid and, to establish a more stable preparation (due to the rapid oxidation of pure xylopinine) to obtain the derivative AXyl which showed analgesic effect comparable to the original EEMO in abdominal constrictions test.

Painful inflammatory conditions are associated with sensitization of nociceptors that compose the nociceptive (pain) pathway, leading to enhanced pain sensations in response to both noxious (termed hyperalgesia) and non noxious (termed allodynia) stimuli. We showed here that EEMO and AXyl produced antinociception against the inflammatory phase of formalin. This result is reinforced by the effective inhibition of the carrageenan-induced mechanical allodynia by the extract and compound. These results suggest that EEMO and AXyl mainly exert their effect by altering the process of sensitization of the nociceptor (a common phenomenon during the inflammatory response) than by blocking the activation of the nociceptor itself. The effectiveness of AXyl in inflammatory pain together with previous evidences of that xylopinine inhibits platelet aggregation (Chen et al. 1996a,b) could also suggest a mechanism of action similar to the NSAIDs for this compound. Nevertheless, further studies are necessary to clarify this point since, as mentioned before, responses that can be reduced by NSAIDs such as fever and oedema formation (Menezes-de-Lima et al. 2006) could not be blocked by AXyl. Because AXyl (0.15 mg/kg, p.o.) promoted a complete inhibition in carrageenan-induced allodynia and formalin-induced nociception and because the ¹H NMR analyses of the alkaloid fraction showed that the major component of F2 fraction was xylopinine, it is herein suggested that the analgesic action shown by EEMO may result at least in part from the presence of this alkaloid. Also, as we mentioned before xylopinine-enriched fraction, freshly prepared and immediately tested showed a similar effect at comparable doses (data not shown).

Another interesting point we have considered is that AXyl could be acting peripherally in the sensitization of the nociceptive fiber. We confirmed that the injection of AXyl at very low doses (0.3–30 ng) directly in the inflamed paw, but not in the contralateral paw, also reversed the decrease of the nociceptive mechanical threshold induced by carrageenan. These results together suggest

that AXyl is acting locally to reduce the sensitization of the nociceptive nerve fiber. In addition, these observations and the fact that EEMO and AXyl was ineffective in **rota-rod and hot-plate** tests confirms a peripheral, opposed to a central effect of this compound and gives additional support that the observed reduction on the nociceptive behavior of the animals is due to an analgesic effect rather than to a change in the motor performance of the animal.

In summary, although *Magnolia* species are not popularly used as analgesic, the present study provides convincing evidence that EEMO and the derivative AXyl exert a pronounced systemic antinociception against nociceptive response caused by acetic acid, formalin and carrageenan in mice. So, it appears that the antinociceptive activity of the ethanolic extract of *M. ovata* is caused by the presence of xylopine which is particularly relevant because those species are widely used in popular medicine in Brazil and throughout the world and because xylopine has been found in other plants of the same genus (Plantinet et al. 1985; Nonato et al. 1990). It seems that this alkaloid reduces the sensitization of nociceptors but the mechanism by which AXyl exerts this effect needs further studies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Cândida A.L. Kassuya is a post-doctoral fellow receiving a grant from CAPES (PRODOC). L.S. Mori is a M.Sc. student supported by CAPES.

References

- Apel, M.A., Lima, M.E.L., Souza, A., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G., Suffredini, I.B., Moreno, P.R.H., 2006. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the **Atlantic** rain forest (São Paulo – **Brazil**). *Pharmacology* on line **3**, 376–383.
- Barros, L.F.L., Barison, A., Salvador, M.J., Mello-Silva, R., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., Stefanello, M.E.A., 2009. Constituents of the leaves of *Magnolia ovata*. *J. Nat. Prod.* **72**, 1529–1532.
- Campbell, J.N., Meyer, R.A., 2006. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* **52**, 77–92.
- Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* **53**, 55–63.
- Chen, K.S., Ko, F.N., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1996a. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Med.* **62**, 133–136.
- Chen, K.S., Ko, F.N., Teng, C.M., Wu, Y.C., 1996b. Antiplatelet of vasorelaxing actions of some benzyloquinoline and phenanthrene alkaloids. *J. Nat. Prod.* **59**, 531–534.
- Coelho, A.A., de Paula, J.E., Espindola, L.S., 2006. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvao & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. *Neotrop. Entomol.* **35**, 133–138.
- de Campos, R.O., Santos, A.R., Vaz, Z.R., Pinheiro, T.R., Pizzolatti, M.G., Cechinel Filho, V., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1997. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). *Life Sci.* **61**, 1619–1630.

- Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., Lopez-Munoz, F.J., 2007. Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 476–482.
- Hunnskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30**, 103–114.
- Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203–210.
- Kassuya, C.A., Cremoneze, A., Barros, L.F., Simas, A.S., Lapa, F.R., Mello-Silva, R., Stefanello, M.E., Zampronio, A.R., 2009. Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *J. Ethnopharmacol.* **124**, 369–376.
- Mendes, G.L., Santos, A.R., Campos, M.M., Tratsk, K.S., Yunes, R.A., Cechinel Filho, V., Calixto, J.B., 1998. Anti-hyperalgesic properties of the extract and of the main sesquiterpene polygodial isolated from the barks of *Drymis winteri* (Winteraceae). *Life Sci.* **63**, 369–381.
- Menezes-de-Lima Jr., O., Kassuya, C.A., Nascimento, A.F., Henriques, M.G., Calixto, J.B., 2006. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **80**, 123–135.
- Mesia-Vela, S., Souccar, C., Lima-Landman, M.T., Lapa, A.J., 2004. Pharmacological study of *Stachytarpheta cayennensis* Vahl in rodents. *Phytomedicine* **11**, 616–624.
- Montenegro, H., Gutierrez, M., Romero, L.L., Ortega-Barria, E., Capson, T.L., Rios, L.C., 2003. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Med.* **69**, 677–679.
- Morato, G.S., Calixto, J.B., Cordeiro, L., de Lima, T.C., Morato, E.F., Nicolau, M., Rae, G.A., Takahashi, R.N., Valle, R.M., Yunes, R.A., 1989. Chemical and pharmacological studies on *Talauma ovata* St. Hil. (Magnoliaceae). *J. Ethnopharmacol.* **26**, 277–286.
- Mors, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A., 2000. Medicinal **Plants** of Brazil. Reference Publications **Inc.**, **Michigan**.
- Nonato, M.G., Gerson, M.J., Truscott, R.J.W., Carver, J.A., 1990. H-NMR assignments of anonaïne and xylopine derivatives from *Talauma gitingensis*. *J. Nat. Prod.* **33**, 1623–1627.
- Plantinet, C., Sevenet, T., Chan, K.C., Bruneton, J., 1985. Alcaloides de *Talauma cf T. obovata* Korthals. Considérations chimiotaxonomiques. In: *Considérations chimiotaxonomiques. Annales Pharmaceutiques, France*, pp. 89–191.
- Samad, T.A., Saperstein, A., Woolf, C.J., 2002. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trends Mol. Med.* **8**, 390–396.
- Santos, A.R., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 417–426.
- Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., Ito, I.Y., Montoia, A., Silva, C.J.F., Barros, L.F.L., 2009. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana de *Talauma ovata*. *Lat. Am. J. Pharm.* **28**, 270–274.
- Stefanello, M.E., Alvarenga, M.A., Toma, I.N., 2002. New neolignans from *Talauma ovata*. *Fitoterapia* **73**, 135–139.
- Stefanello, M.E.A., Alvarenga, M.A., 1997. Constituents of *Talauma ovata* bark. *Fitoterapia* **68**, 475–476.
- Svensson, C.I., Yaksh, T.L., 2002. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 553–583.
- Tsai, I.L., Liou, Y.F., Lu, S.T., 1989. Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi* **5**, 132–145.
- Villar, A., Mares, M., Rios, J.L., Canton, E., Gobernado, M., 1987. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. *Pharmazie* **42**, 248–250.
- Woolf, C.J., Mannion, R.J., 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* **353**, 1959–1964.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109–110.